

Aus dem Veterinär-Physiologischen Institut
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Bioverfügbarkeit des Flavonols Quercetin beim Hund

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Marianne Reinboth
aus Osterode am Harz

Leipzig, 2010

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Uwe Truyen

Betreuer: Prof. Dr. Rainer Cermak

Gutachter: Prof. Dr. Rainer Cermak, Veterinär-Physiologisches Institut, Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig

Prof. Dr. Gerald Rimbach, Institut für Humanernährung und Lebensmittelkunde, Agrar- und Ernährungswissenschaftliche Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Tag der Verteidigung: 12. Oktober 2010

Widmung

meinem Mann Frank Reinboth,
meinen Kindern Mattis und Leonie,
meinen Eltern

und

Herrn Professor Dr. Fritz R. Ungemach

(† 20.12.2009)

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	3
2.1	Funktionen von Flavonoiden in Pflanzen	3
2.2	Biosynthese und Struktur von Flavonoiden	4
2.3	Flavonoidwirkungen im menschlichen und tierischen Organismus	8
2.3.1	Antioxidative Eigenschaften	10
2.3.2	Wirkungen auf Enzyme und Transportproteine des Arzneistoffwechsels	12
2.4	Bioverfügbarkeit und Stoffwechsel des Flavonols Quercetin	13
2.4.1	Bioverfügbarkeit von Quercetin	13
2.4.2	Einfluss des Futters	15
2.4.3	Einfluss des Glycosylierungsmusters	16
2.4.4	Intestinale Absorption und Metabolismus	18
2.4.5	Einfluss der intestinalen Mikroflora	21
2.4.6	Bindung an Plasmaproteine	22
2.4.7	Gewebeverteilung	23
2.4.8	Exkretion	24
2.5	Zielsetzung	25
3	Tiere, Material und Methoden	26
3.1	Versuchstiere und Haltungsbedingungen	26
3.2	Verwendete Flavonole	27
3.3	Durchführung des Tierversuchs	28
3.3.1	Allgemeine Durchführung der Versuche	28
3.3.2	Bioverfügbarkeit von Quercetin und Rutin (je 30 mg/kg KM)	29
3.3.3	Absolute Bioverfügbarkeit von Quercetin	30
3.3.4	Relative Bioverfügbarkeit verschiedener Quercetinglycoside	31
3.4	Probenaufarbeitung	31
3.5	HPLC	33
3.5.1	Methodenvalidierung und -kalibrierung	34
3.5.2	Berechnung der pharmakokinetischen Parameter	40
3.5.3	Statistische Auswertung	41
4	Ergebnisse	42
4.1	Bioverfügbarkeit von Quercetin und Rutin (je 30 mg/kg KM)	42

4.1.1	Quercetin-Aglycon	42
4.1.2	Rutin	46
4.2	Absolute Bioverfügbarkeit Quercetin	48
4.3	Relative Bioverfügbarkeit verschiedener Quercetinglycoside	52
4.3.1	Quercetin-Aglycon	53
4.3.2	Rutin	56
4.3.3	Isoquercitrin	57
5	Diskussion	62
5.1	Zielsetzung der Studie	62
5.2	Methodische Aspekte	62
5.2.1	Auswahl der Versuchstiere und Versuchsanordnung	62
5.2.2	Wahl der Testmahlzeit	63
5.2.3	Einfluss der Zeitpunkte für die Probennahme auf die Berechnung der Verfügbarkeit	64
5.2.4	Analysemethode	65
5.3	Plasmametaboliten von Quercetin	66
5.4	Absolute Bioverfügbarkeit von Quercetin	69
5.5	Relative Bioverfügbarkeit verschiedener Quercetinglycoside	70
5.5.1	Isoquercitrin	70
5.5.2	Rutin	71
5.6	Bezug der pharmakokinetischen Daten zu potentiellen <i>In-vivo</i> -Wirkungen	73
5.7	Schlussfolgerungen	75
6	Zusammenfassung	76
7	Summary	78
8	Literaturverzeichnis	80
9	Anhang	102
9.1	HPLC-Chemikalien	102
9.2	Validierung der HPLC-Methode	103
10	Lebenslauf	108
	Danksagung	109

Liste der Abkürzungen

ANOVA	(<i>analysis of variance</i>) Varianzanalyse
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	(<i>area under the curve</i>) Fläche unter der Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve
AUMC	(<i>area under the moment curve</i>) Fläche unter der Zeit-gewichteten Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve
AUC _{Total}	Summe der AUC-Werte aller analysierten Flavonole
BCRP	<i>breast cancer resistance protein</i>
C _{max}	maximale Plasmakonzentration
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
F	absolute Bioverfügbarkeit
g	Erd- bzw. Gravitationsbeschleunigung (x g = Vielfaches von g)
HPLC	(<i>high performance liquid chromatography</i>) Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
KM	Körpermasse
l	Liter
λ_z	terminale Eliminationsgeschwindigkeitskonstante
LOD	(<i>limit of detection</i>) Nachweisgrenze
LOQ	(<i>limit of quantification</i>) Quantifizierungsgrenze
LPH	Lactase-Phloridzin-Hydrolase
MRP	<i>multi-drug resistance associated protein</i>
MRT	(<i>mean residence time</i>) mittlere Verweildauer
n	Anzahl
OATP	<i>organic anion transporting polypeptide</i>
P-gp	P-Glykoprotein

RE	<i>(relative error of quantification)</i> relativer Fehler
RSD	<i>(relative standard deviation)</i> relative Standardabweichung
SEM	<i>(standard error of the mean)</i> Standardfehler
SGLT1	<i>sodium glucose dependent transporter 1</i>
T _{max}	Zeit bis zum Erreichen der maximalen Plasmakonzentration
TM	Trockenmasse
UDP	Uridindiphosphat

1 Einleitung

Flavonoide, darunter das weit verbreitete Flavonol Quercetin, kommen als sogenannte sekundäre Metaboliten in fast allen höheren Pflanzen vor und werden daher von Menschen und Tieren mit pflanzlicher Nahrung aufgenommen (KÜHNAU 1976; HERTOOG et al. 1993c). Flavonoide sind Polyphenole, die aus je zwei aromatischen und einem O-heterozyklischen Kohlenstoffring bestehen. Zurzeit sind über 6500 Vertreter dieser Gruppe bekannt. Die meisten Flavonoide kommen in der Natur nicht frei vor, sondern mit diversen Zuckermolekülen konjugiert als Flavonoidglycoside. Mehr als 80 verschiedene Zucker sind bisher in Flavonoidglycosiden nachgewiesen worden, allein für Quercetin sind bisher 179 verschiedene Glycoside beschrieben. In den Pflanzen sind Flavonoide an der Photosynthese, Wachstums- und Differenzierungsvorgängen beteiligt, sie wirken antioxidativ, antifungal und bakterizid.

In der Medizin und Gesundheitsforschung sind Flavonoide in neuerer Zeit im Hinblick auf therapeutische und prophylaktische Anwendungen auf großes Interesse gestoßen, da einigen von ihnen zytoprotektive und gesundheitsfördernde Wirkungen zugesprochen werden. In epidemiologischen Studien wurden Hinweise darauf gefunden, dass eine erhöhte Aufnahme von Flavonolen mit einem verminderten Auftreten arteriosklerotischer Prozesse in Zusammenhang gebracht werden kann (FRANKEL et al. 1993; KNEKT et al. 2002). Mehrere *In-vitro*-Studien konnten zeigen, dass verschiedene Flavonole Zellschädigungen durch oxidiertes Low-density-Lipoprotein hemmen konnten, welche bei der Pathogenese der Arteriosklerose eine entscheidende Rolle spielen sollen. Weitere Untersuchungen weisen auf eine mögliche präventive Wirkung von Flavonoiden bei bestimmten karzinogenen Tumorformen, entzündlichen Erkrankungen, Bluthochdruck und Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes mellitus hin (MIDDLETON et al. 2000; HAVSTEEN 2002; YANG et al. 2008).

Auch Haustiere, insbesondere Hunde, sind mit fortschreitendem Lebensalter vermehrt von chronisch degenerativen und entzündlichen Erkrankungen, Stoffwechselstörungen wie Diabetes mellitus oder verschiedenen Tumorerkrankungen betroffen.

In der Annahme, dass gesundheitsprotektive Wirkungen von Flavonoiden auch bei Hunden zu erzielen seien, werden Flavonoide wie das Flavonol Quercetin in zunehmenden Maße Hundefuttermitteln zugesetzt. Diese werden von den Futtermittelherstellern entweder in Form flavonoidhaltiger Pflanzenteile zugesetzt oder dem Futter

als Einzelsubstanz zugefügt. Reines Quercetin ist auch als Nahrungsergänzungsmittel im Handel erhältlich. Die Bioverfügbarkeit von Quercetin ist bei der Spezies Hund allerdings nicht bekannt. Für eine Abschätzung möglicher Wirkungen, aber auch möglicher Risiken in Form von Nebenwirkungen, sind Untersuchungen zur Pharmakokinetik und Bioverfügbarkeit in der jeweiligen Zielspezies notwendig. In bisherigen Studien am Menschen, bei Schweinen und bei Ratten wurde bereits gezeigt, dass sich Bioverfügbarkeit und Metabolisierung von Quercetin zwischen den verschiedenen Spezies unterscheidet und außerdem auch von dem Glycosylierungsmuster der natürlich vorkommenden Quercetinglycoside abhängt. Ziel dieser Studie war es, die absolute Bioverfügbarkeit des Flavonols Quercetin bei der Spezies Hund zu bestimmen sowie seine relative Bioverfügbarkeit aus Quercetinglycosiden, welche Futtermitteln zugesetzt werden, zu untersuchen.

Zur Bestimmung der absoluten Bioverfügbarkeit von Quercetin wurde das Flavonol sowohl intravenös als auch oral verabreicht. Weiterhin wurde der Einfluss der Zuckerreste der zwei häufig vorkommenden Quercetinglucoside Isoquercitrin (Quercetin-3-O-Glucosid) und Rutin (Quercetin-3-O-Glucorhamnosid) auf die Pharmakokinetik des Flavonols untersucht.

2 Literaturübersicht

2.1 Funktionen von Flavonoiden in Pflanzen

Flavonoide sind im Pflanzenreich ubiquitär vorkommende Metaboliten des sekundären Stoffwechsels. Sie gehören wie Phenolsäuren, Lignane und Stilbene zur großen Gruppe der pflanzlichen Polyphenole (SCALBERT und WILLIAMSON 2000). Die höchsten Flavonoidkonzentrationen sind im Allgemeinen in unreifen pflanzlichen Geweben, in denen aktive Zellteilung vorkommt, sowie in den dem Licht zugewandten Anteilen von Pflanzen, wie Blättern, Blüten und Früchten zu finden (HERRMANN 1990).

Da Flavonoide lichtabhängig in Photosynthese betreibenden Zellen synthetisiert werden (MANACH et al. 1996a), findet eine Anreicherung der Flavonoide bevorzugt in der Epidermis statt. Hier sind sie entweder gelöst in den Vakuolen (v. a. Flavon- und Flavonolglycoside) oder auch in den epikutikularen Bereichen (v. a. Methylester) anzutreffen. Eine Ausnahme bildet die unterirdisch wachsende Zwiebel, in der die Flavonoide insgesamt relativ gleichmäßig verteilt sind (PRICE und RHODES 1997).

In den photosynthetisch aktiven Zellen katalysieren die Flavonoide während der Lichtphase Elektronentransportprozesse (DAS 1994). Gleichzeitig verhindern sie Schädigungen des Pflanzengewebes durch ihre Eigenschaft, als effektive UV-B-Filter wirken zu können. (HARBORNE und WILLIAMS 2000). Daneben sind sie laut SHIRLEY (1996) in der Lage, als Radikalfänger im Zuge der Photosynthese gebildete oder durch ultraviolette Strahlung freigesetzte reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zu neutralisieren. Überdies besitzen Flavonoide zahlreiche weitere Eigenschaften, die im Zusammenhang mit Wachstum, Fortpflanzung und der Abwehr von Pathogenen und Fressfeinden stehen sowie bestäubende Insekten anlocken.

Die Verbindungen werden während der normalen Entwicklung des Pflanzengewebes synthetisiert. Ihre Produktion kann aber auch als Antwort auf eine Infektion, eine Verletzung oder umweltbedingten Stress wie erhöhte Strahlung und extreme Witterungsverhältnisse (Dürre, Kälte) induziert werden (HARBORNE und WILLIAMS 2000; TREUTTER 2005).

Flavonole kommen in unterschiedlichen Konzentrationen in nahezu allen pflanzlichen Produkten vor. Quercetin und Kämpferol sind in dieser Flavonoidunterklasse die dominierenden Vertreter. Besonders reichhaltige Quellen sind zum Beispiel Zwiebeln, Brokkoli, Blaubeeren, Weintrauben und auch *Ginkgo biloba* (MANACH et al. 2004, 2005).

Unter den Lebensmitteln stellen neben Obst, Gemüse und Salat insbesondere Getränke wie Rotwein und Tee die Hauptquellen für Polyphenole dar. Die geschätzte Aufnahme von Flavonolen beim Menschen in den USA und in Holland liegt bei 20 bis 25 mg, in Italien bei 5 bis 125 mg täglich (HERTOG et al. 1993b; ROGGI et al. 1996; SAMPSON et al. 2002). KÜHNAU (1976) schätzte die Aufnahme von Flavonoiden in den USA auf etwa 1 g pro Tag, was nach heutigem Erkenntnisstand allerdings als überschätzt angesehen wird. Das in der Nahrung dominierende Flavonoid ist nach HERTOGE et al. (1995) Quercetin mit einer durchschnittlichen Aufnahmemenge von etwa 16 mg pro Tag. In Bayern liegt die durchschnittliche Tagesaufnahme an Flavonoiden nach LINSEISEN et al. (1997) bei ca. 54 mg pro Tag. Die Flavonolmenge liegt bei ca. 12 mg, von denen Quercetin mit 10,3 mg den Hauptteil ausmacht.

2.2 Biosynthese und Struktur von Flavonoiden

Das gemeinsame Strukturmerkmal von Flavonoiden ist ein Polychromangrundgerüst, bestehend aus drei aromatischen Ringen A, B, und C (Abbildung 1). Dieses Grundgerüst, bei dem die aromatischen Ringe A und B über drei C-Atome aneinandergeschlüsselt als Diphenylpropan ($C_6-C_3-C_6$) vorliegen, wird auch als Flavan bezeichnet. Durch ein Sauerstoffatom erfolgt in der Regel ein Ringschluss dieser drei C-Atome zum heterozyklischen Ring C. Ring A ist mit dem O-haltigen heterozyklischen Ring C kondensiert, der in Position 2 Ring B als Phenylrest aufweist (FORMICA und REGELSON 1995; BRAVO 1998; MANACH et al. 2004).

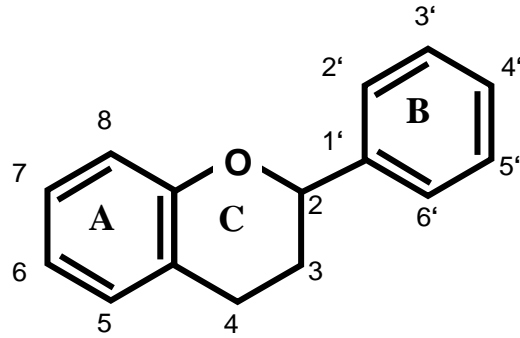


Abbildung 1: Flavan-Grundgerüst

Die Biosynthese der Flavonoide erfolgt über den Phenylpropanoidweg, über den der Säugerorganismus nicht verfügt. Alle an der Flavonoidbiosynthese mitwirkenden Stoffe entstammen dem Kohlenhydratstoffwechsel der Pflanze. Es erfolgt eine stufenweise Kondensation einer aktivierten Hydroxyzimtsäure (C-6-C-3-Einheit) mit drei Molekülen Malonyl-Coenzym A (liefert C-2-Einheiten) zu einem Chalkon (C-15-Einheit). Dabei wird die Hydroxyzimtsäure aus der aromatischen Aminosäure Phenylalanin, dem Endprodukt des sogenannten Shikimisäure-Weges, in der Pflanze synthetisiert (Abbildung 2). Vom Chalkon ausgehend werden durch anschließenden Ringschluss und verschiedene Hydroxylierungen, Oxidationen und Reduktionen am Ring C letztlich die verschiedenen Verbindungen der unterschiedlichen Flavonoidunterklassen gebildet (SALUNKHE et al. 1990; SHIRLEY 1996; AHERNE und O'BRIEN 2002). Die Ringe A und B erlauben eine Vielzahl an Substitutionsmustern innerhalb einer jeden Flavonoidunterklasse.

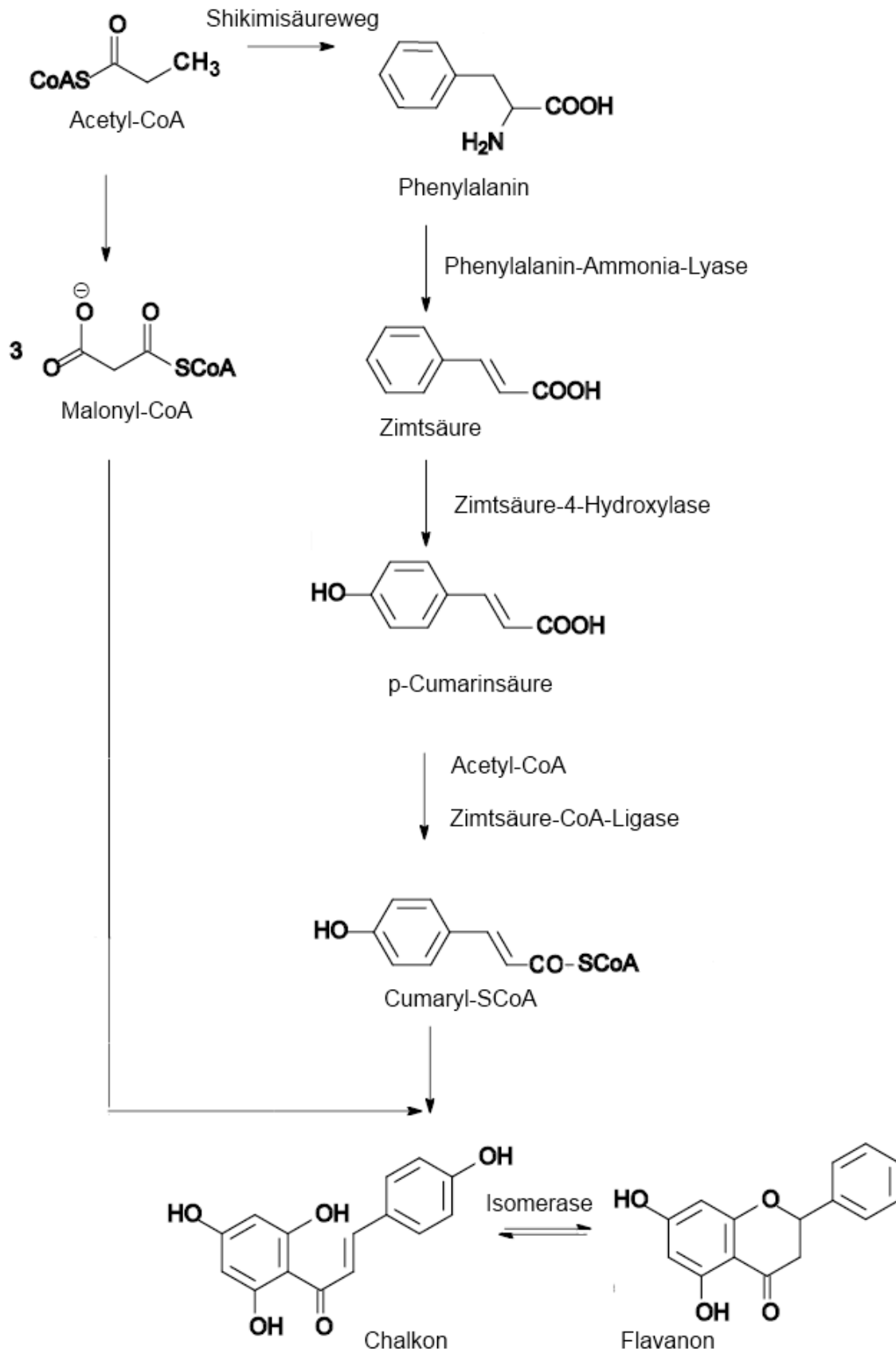


Abbildung 2: Flavonoidbiosynthese

Abhängig von Hydroxylierungsgrad, Oxidationsgrad des Ringes C, Art der Substituenten und Polymerisierungsgrad werden die Flavonoide in insgesamt 16 Unterklassen unterteilt (AGULLO et al. 1996; BORS et al. 1997; BRAVO 1998; BERHOW und VAUGHN 1999), (Abbildung 3).

Die Klasse der Flavonole ist durch eine Doppelbindung zwischen dem C-2- und dem C-3-Atom und eine Hydroxygruppe in Position 3 des C-Ringes gekennzeichnet. Die am weitesten verbreiteten und häufigsten Flavonole sind Quercetin (3,5,7,3',4'-Pentahydroxyflavon) und Kämpferol (3,5,7,4'-Tetrahydroxyflavon) (HERRMANN 1988, 1990). Zusätzliche Hydroxylierungen an den C-Atomen 3' und 4' kommen am häufigsten vor (RICE-EVANS et al. 1996).

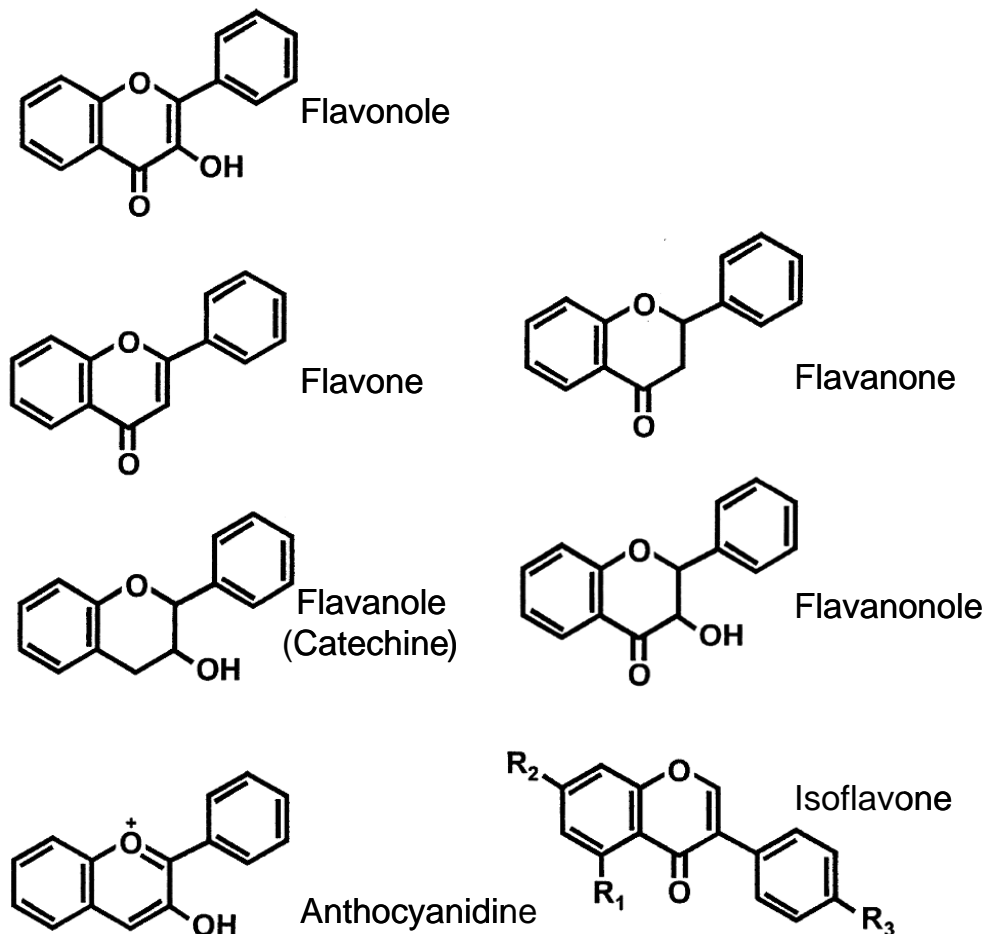


Abbildung 3: Strukturmerkmale einiger Flavonoidunterklassen

2.3 Flavonoidwirkungen im menschlichen und tierischen Organismus

In mehreren epidemiologischen Studien wurde gezeigt, dass eine hohe Aufnahme von Flavonoiden mit der Nahrung negativ mit dem Auftreten arteriosklerotischer Prozesse und kardiovaskulärer Erkrankungen korreliert (FRANKEL et al. 1993; HER-TOG et al. 1993a; RICE-EVANS et al. 1996; KNEKT et al. 1996, 2002).

In-vitro-Studien konnten zeigen, dass verschiedene Flavonole Zellschädigungen durch oxidiertes *Low-density*-Lipoprotein verhindern können. Oxidierte *Low-density*-Lipoproteine sind nach heutigem Kenntnisstand kausal beteiligt an der Pathogenese arteriosklerotischer Veränderungen und daraus resultierenden kardiovaskulären Erkrankungen und zahlreiche *In-vitro*-Studien belegen, dass eine Hemmung der Oxidation von *Low-density*-Lipoproteinen der Entstehung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen präventiv entgegen wirkt (FRANKEL et al. 1993; AVIRAM und FUHRMAN 1998; CHOPRA et al. 2000; DA SILVA et al. 2000).

Zudem scheinen Flavonoide die Gefahr fataler Komplikationen nach akuten Myokardinfarkten in der Postinfarktperiode sowie die daraus resultierende Mortalität vermindern zu können (MUKAMAL et al. 2002). Hierbei könnten verschiedene Mechanismen involviert sein, wie das Abfangen freier Radikale durch Flavonoide und die Bildung von Chelatkomplexen mit Metallionen, welche als Prooxidantien wirken können (KANDASWAMI und MIDDLETON 1994; RICE-EVANS et al. 1996; COOK und SAMMAN 1996; VAN ACKER et al. 1998; MIDDLETON et al. 2000).

GELEIJNSE et al. (2002) führten diese positiven Effekte vorrangig auf unspezifische antioxidative und antithrombotische Eigenschaften der Flavonoide zurück. KAWAI et al. (2008) hingegen postulieren, dass aktivierte Makrophagen in verletzten bzw. entzündlich veränderten Arterien potentielle Zielzellen von Quercetinmetaboliten sein könnten. Hingegen schützt eine chronische Quercetin-Aufnahme Athleten nicht vor leistungsinduziertem oxidativem Stress und entzündlichen Prozessen (MCANULTY et al. 2008).

AW (1999) schreibt dem Gleichgewicht zwischen (pro)oxidativen und antioxidativen Prozessen eine Schlüsselrolle zu. Störungen dieses Gleichgewichts werden für eine Vielzahl von Stoffwechselstörungen bzw. Krankheitskomplexen in Zusammenhang gebracht, wobei es sich vorrangig um degenerative Erkrankungen, wie Herz-Kreislauf-erkrankungen, Krebs, Alzheimer, aber auch chronische und akute Entzündungsprozesse handelt (ARUOMA 1998; BEHL und MOOSMANN 2002). Im oxidativen Stoffwechsel eukaryotischer Zellen entstehen natürlicherweise an verschiedenen Stellen Sauerstoffradikale und andere hochreaktive Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen, wie z. B. Hydroxyl- und Superoxidradikale oder Peroxynitrit (KHAN und WILSON 1995; JI und LEICHTWEIS 1997; CHANDRA et al. 2000). Diese Verbindungen werden in der Regel durch verschiedene zelleigene Enzymsysteme wie Superoxid-Dismutasen, Katalase, Glutathion-Peroxidasen sowie nicht enzymatische Systeme wie z. B. Glutathion, α -Tokopherol und Ascorbat deaktiviert (JI und LEICHTWEIS 1997; FINKEL und HOLBROOK 2000; CHANDRA et al. 2000). Bei einer Überlastung dieser Schutzmechanismen (Überwiegen prooxidativer Prozesse, oxidativer Stress) kann es zu oxidativen Schädigungen von Biopolymeren wie Proteinen, Membranlipiden und Nukleinsäuren kommen. Die oben genannten Krankheitskomplexe scheinen mit oxidativem Stress einherzugehen (BÖHM et al. 1998; ARUOMA 1998).

Epidemiologische Studien deuten außerdem einen Zusammenhang zwischen Flavonoidaufnahme und einem verminderten Risiko für das Auftreten von Osteoporose, Diabetes mellitus und bestimmten Krebserkrankungen an (GRAF et al. 2005a). In einer Vielzahl von *In-vitro*-Studien konnten Flavonoide zahlreiche Enzyme und Signalkaskaden beeinflussen und in Schlüsselreaktionen des Metabolismus eingreifen, was Anlass zu vielen Hypothesen über prophylaktische und therapeutische Flavonoidwirkungen gegeben hat (MIDDLETON et al. 2000; HAVSTEEN 2002). MIDDLETON et al. (2000) veröffentlichten eine umfangreiche Übersicht über durch Flavonoide modulierbare Enzyme. Zum Beispiel hemmt Quercetin die Phospholipase A2, die zur Freisetzung von Arachidonsäure aus Phospholipiden führt und bei Entzündungsprozessen eine wichtige Rolle spielt (WELTON et al. 1988). Von der Arachidonsäure ausgehend werden entweder durch Cyclooxygenasen Prostaglandine und Thromboxane oder durch Lipoxygenasen Leukotriene gebildet. Für Quercetin und andere Fla-

vonoide wurden inhibitorische Effekte sowohl auf Cyklooxygenasen als auch auf Lipooxygenasen gezeigt (WELTON et al. 1988; FORMICA und REGELSON 1995).

Verschiedene Fütterungsstudien von Quercetin an Ratten untersuchten und zeigten antihypertensive Effekte bei dieser Spezies *in vivo* (DUARTE et al. 2001; MACHHA und MUSTAFA 2005; SÁNCHEZ et al. 2006; YAMAMOTO und OUE 2006; EDWARDS et al. 2007; MACHHA et al. 2007b; RIVERA et al. 2008).

Eine generelle Aussage bezüglich der Toxizität von Flavonoiden ist aufgrund ihrer Vielfalt und ihrer unterschiedlichen Absorption und Verstoffwechselung nicht möglich. So kann eine über mehrere Wochen verabreichte tägliche Dosis von 150 mg/kg des Flavonols Epigallocatechingallat für Hunde tödlich sein (ISBRUCKER et al. 2006). Oral verabreichtes Quercetin scheint hingegen selbst in hohen Dosen keine akute oder chronische Toxizität zu bewirken (OKAMOTO 2005).

2.3.1 Antioxidative Eigenschaften

Bezüglich der antioxidativen Effekte von Flavonoiden werden verschiedene Wirkungsmechanismen diskutiert, die bisher fast ausschließlich *in vitro* gezeigt wurden. Zum einen wirken Flavonoide als Radikalfänger. Sie können aufgrund ihres geringen Redoxpotentials reaktive Sauerstoffspezies reduzieren, wobei sie ein Elektron aus einer phenolischen OH-Gruppe auf das Radikal übertragen, so dass dieses seine hohe Reaktivität verliert (WISEMAN et al. 1997; BORS et al. 1998; PIETTA 2000). Das Flavonoid selbst wird dabei zum Radikal, welches aber im Vergleich zu Sauerstoffradikalen relativ reaktionsträge ist (BORS et al. 1998; PIETTA 2000). Es kann mit weiteren Radikalen reagieren und in eine Chinonstruktur übergehen (PIETTA 2000; PANNALA et al. 2001). Die Fähigkeit von Flavonoiden, an Ein-Elektronen-Übergängen teilzunehmen, beruht auf ihrer spezifischen chemischen Struktur. Von besonderer Bedeutung scheint neben den 3'- und 4'-OH-Gruppen am Ring B die Anwesenheit der 2,3-Doppelbindung in Verbindung mit einer 4-Oxogruppe im Ring C zu sein, welche eine Elektronendelokalisation über das gesamte Ringsystem bewirkt, ohne dass die Ringstruktur an Stabilität verliert. Eine zusätzliche Hydroxygruppe am C3-Atom des Rings C erhöht ebenfalls die Stabilität des Flavonoidradikals und somit die antioxidative Kapazität des Flavonoids (BORS et al. 1998; PIETTA 2000). Des Weiteren bewirkt die 2,3-Doppelbindung, dass die drei Ringe eines Flavonoids in ei-

ner Ebene liegen, was sich ebenfalls auf das antioxidative Potential auswirkt, da eine nicht planare Anordnung möglicherweise zu sterischen Behinderungen führt (VAN ACKER et al. 1996). Die genannten chemischen Strukturmerkmale treffen vor allen Dingen auf die Gruppe der Flavonole zu und erklären deren im Vergleich zu anderen Flavonoiden hohes antioxidatives Potential (JOVANOVIĆ et al. 1996; PIETTA 2000). Zum anderen vermögen Flavonoide mit zwei benachbarten Hydroxylgruppen an den Positionen 3' und 4' im B-Ring sowie einer Carbonylstruktur im C-Ring Metallionen zu komplexieren und dadurch die Metallionen in ihrer Eigenschaft als Prooxidantien zu inaktivieren, wobei Flavonole aufgrund ihrer Struktur besonders stabile Chelatkomplexe bilden (KÜHNAU 1976; KANDASWAMI und MIDDLETON 1994; FERRALI et al. 1997; PIETTA 2000). Außerdem hemmen Flavonoide verschiedene Enzyme, die an der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und oxidativen Reaktionen beteiligt sind, z. B. die Xanthinoxidase, NADH-Oxidase, Cyclooxygenase und Lipoxygenase (KANDASWAMI und MIDDLETON 1994; BÖHM et al. 1998; PIETTA 2000). Des Weiteren zeigen mehrere Untersuchungen, dass insbesondere Flavonole, Flavanole sowie Anthocyanidine *in vitro* effektivere Antioxidantien als das wasserlösliche Vitamin-E-Analog Trolox und als Vitamin C sind (CAO et al. 1997; WISEMAN et al. 1997; BORS et al. 1998; PIETTA 2000). Flavonoide können bei der Regeneration wichtiger etablierter Antioxidantien wie Vitamin C und Vitamin E eine Rolle spielen (KANDASWAMI und MIDDLETON 1994; BORS et al. 1995; PIETTA 2000; MIURA et al. 2000). In diesem Zusammenhang wäre ein Vitamin-E-sparender Effekt in der Schweinemast zur Steigerung der antioxidativen Kapazität sowie der Fleischqualität von Interesse. Doch während in Zellkulturversuchen und bei Labortieren synergistische Effekte zwischen Polyphenolen und Vitamin E gezeigt wurden, konnten AUGUSTIN et al. (2008) in Versuchen mit Polyphenol-Supplementationen aus Grüntee diese Beobachtung bei wachsenden Schweinen nicht verifizieren.

Bei *In-vitro*-Versuchen ist immer zu berücksichtigen, dass das Redoxverhalten von Flavonoiden stark abhängig von den gewählten Versuchsparametern wie pH-Wert, Hydrophilie des Versuchsmediums sowie von der effektiven Konzentration und dem Redoxpotential des Reaktionspartners ist. Nur in wenigen Studien wurde die Tatsache berücksichtigt, dass im Plasma vorrangig Flavonoidkonjugate statt (der überwiegend *in vitro* untersuchten) Flavonoidaglyca vorkommen. So untersuchten TERAO et al. (2001) den Verbrauch bestimmter Antioxidantien, wie β -Carotin und α -Tokopherol

in *Low-density*-Lipoproteinen nach Zugabe von Quercetin-3-Glucuronid und von Quercetin-Aglycon; beide Flavonoide verringerten den Verbrauch von β -Carotin und α -Tokopherol.

Es muss jedoch betont werden, dass Flavonoide, abhängig von den Bedingungen, auch prooxidativ wirken können (SAHU und GRAY 1996; BÖHM et al. 1998; SKIBOLA und SMITH 2000; VAN DER WOUDE et al. 2002; RIETJENS et al. 2002; AWAD et al. 2002).

2.3.2 Wirkungen auf Enzyme und Transportproteine des Arzneistoffwechsels

Zahlreiche *In-vitro*-Studien zeigten eine Wirkung von Flavonoiden auf Transportproteine, welche im Fremdstoffmetabolismus eine wichtige Rolle spielen. So kann beispielsweise durch Flavonoide der Fremdstofftransport über Transporter der *ATP binding cassette transport protein family* wie beispielsweise das P-Glykoprotein (P-gp), *multi-drug resistance associated proteins 1* und *2* (MRP1/2) oder das *breast cancer resistance protein* (BCRP) moduliert werden (BRAND et al. 2006; MORRIS und ZHANG 2006). Aber auch der Stofftransport über Mitglieder der sogenannten *solute carrier family* (SLC) wie beispielsweise über das *rat organic anion-transporting polypeptide* Oatp3 oder über das humane OATP2B1 konnte in Zellkulturstudien demonstriert werden (DRESSER et al. 2002; SATOH et al. 2005; FUCHIKAMI et al. 2006)

Weiterhin kann die Expression und Aktivität von Cytochrom P450-Monooxygenasen und sogenannten Phase II-Enzymen wie Uridin-5'-diphosphat (UDP)-Glucuronosyltransferasen und Sulfotransferasen, die im Fremdstoffmetabolismus eine entscheidende Rolle spielen, durch diverse Flavonoide beeinträchtigt werden (SUN et al. 1998; BOCK et al. 2000; WALLE und WALLE 2002; PETRI et al. 2003; VAN DER LOGT et al. 2003; SUGATANI et al. 2004). Somit haben Flavonoide, zumindest in hohen Konzentrationen, das Potential, mit dem Transport und dem Stoffwechsel von Arzneistoffen zu interagieren und somit die Pharmakokinetik letzterer zu modulieren (CERMAK und WOLFFRAM 2006; CERMAK 2008). Eine solche Flavonoid-Arzneistoff-Interaktion beobachteten WANG et al. (2004) in einer Studie an Schweinen, welchen gleichzeitig eine therapeutische Dosierung des Digitalisglykosids Digoxin zusammen mit Quercetin in einer Dosierung von 50 mg/kg KM oral verabreicht worden war. Bei den Tieren kam es durch massive Erhöhung der Digoxin-

Plasmaspiegel zu einer Digitalisintoxikation, die für die meisten Tiere tödlich endete. Diese Wirkung kam wahrscheinlich durch Hemmung des P-gp durch Quercetin zustande, welche zu einer deutlichen Erhöhung der Bioverfügbarkeit von Digoxin führte (WANG et al. 2004).

Von den zahlreichen Studien, die eine Wirkung von Flavonoiden auf die Genexpression diverser Proteine beschrieben haben, sei an dieser Stelle nur eine neuere Studie an Hunden erwähnt. SALAS et al. (2009) konnten mit Hilfe von Microarrays zeigen, dass die Fütterung flavonoidreicher Extrakte zu einer Änderung der Genexpression in den Leukozyten der betroffenen Hunde führte.

2.4 Bioverfügbarkeit und Stoffwechsel des Flavonols Quercetin

2.4.1 Bioverfügbarkeit von Quercetin

Voraussetzung für eine über den Gastrointestinaltrakt hinausreichende Wirkung von mit dem Futter aufgenommenen Flavonolen ist eine ausreichende Bioverfügbarkeit derselben. Für viele Nährstoffe wird deren Bioverfügbarkeit meist mit dem Grad ihrer Umsetzung oder spezifischer Wirkungen im Organismus definiert. Dies schließt ihre Verdauung, Absorption sowie ihre metabolischen Effekte mit ein (SCHÜMANN et al. 1994). Allerdings setzt dies voraus, dass für die Bestimmung der Bioverfügbarkeit Stoffwechseleffekte eindeutig dem Nährstoff zugeordnet werden können und diese auch quantifizierbar sein müssen. Dies ist jedoch für Flavonoide nicht möglich.

Zum einen ist die Zuordnung von Flavonoiden zu den Nährstoffen strittig. Obwohl diese pflanzliche Substanzgruppe bereits von KÜHNAU (1976) als „semi-essentiell“ bezeichnet wurde und deren regelmäßige diätetische Aufnahme von manchen Autoren als essentiell für das Erreichen der maximal möglichen Lebensspanne eines Individuums angesehen wird (HOLST und WILLIAMSON 2008), sind diese Behauptungen wissenschaftlich nicht gesichert (DUTHIE et al. 2003; KROON et al. 2004)

Zum anderen fehlen Biomarker, mit denen die Verfügbarkeit von Flavonoiden spezifisch bestimmt werden könnte. In manchen bisherigen Studien wurde aufgrund der starken antioxidativen *In-vitro*-Wirkung vieler Flavonoide der Anstieg der antioxidativen Kapazität des Blutplasmas nach oraler Aufnahme flavonoidreicher Nahrungsmittel

tel als Maß für deren Bioverfügbarkeit bestimmt (DUTHIE et al. 2003; SERAFINI et al. 2003). Dabei wurde jedoch meist übersehen, dass die relativ geringen Plasmakonzentrationen der Flavonoide (maximal wenige $\mu\text{mol/l}$) die gemessenen Anstiege der antioxidativen Kapazität nicht erklären konnten (HALLIWELL 2003). LOTITO und FREI (2004) konnten hingegen zeigen, dass nach Aufnahme bestimmter flavonoidreicher Nahrungsmittel der postprandiale Anstieg anderer antioxidativ wirkender Stoffwechselmetaboliten wie Harnsäure den Anstieg der antioxidativen Kapazität des Plasmas vollständig erklären kann. Daraus ergibt sich, dass die antioxidative Kapazität des Blutplasmas als Maß für die Bioverfügbarkeit von Flavonoiden ungeeignet ist. Andere Flavonoid-spezifische Biomarker konnten bislang nicht identifiziert werden.

Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die pharmakologische Definition der Bioverfügbarkeit zugrunde gelegt. Hierbei wird die Bioverfügbarkeit durch die Geschwindigkeit und das Ausmaß der Wirkstoffabsorption am Wirkort bzw. im Blut bestimmt (ANON. 2004). Zur Messung derselben werden die Wirkstoffkonzentrationen im Blutplasma zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt und aus den erhaltenen Plasmakonzentrations-Zeit-Verläufen können pharmakokinetische Parameter bestimmt werden. Die Bioverfügbarkeit wird dabei als Fläche unter der Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve (*area under the curve*, AUC) berechnet.

Hierbei ist es zur Bestimmung der oralen oder absoluten Bioverfügbarkeit nötig, im selben Individuum neben der Bestimmung der Plasmakonzentrations-Zeit-Verläufe nach oraler Wirkstoffaufnahme auch die Verläufe nach intravenöser Applikation zu messen. Da bei letzterer die Bioverfügbarkeit *per definitionem* 100 % beträgt, ergibt sich hieraus ein Referenzwert, auf den man die nach oraler Wirkstoff-Verabreichung erhaltenen Werte beziehen kann.

Nach dieser Methode wurde bereits beim Schwein und bei der Ratte die absolute Bioverfügbarkeit von Quercetin bestimmt. Beim Schwein betrug diese für das Quercetin-Aglycon lediglich 0,5 % (ADER et al. 2000). Es muss jedoch angemerkt werden, dass der größte Teil des absorbierten Quercetins im Blutplasma konjugiert vorliegt, also vor allem in glucuronidierter und sulfatierter Form. Bei Berücksichtigung dieser Metaboliten betrug die absolute Bioverfügbarkeit beim Schwein etwa 17 % (ADER et al. 2000). In einer Studie mit Ratten wurden ähnliche Werte beobachtet, wobei die absolute Bioverfügbarkeit von der Zubereitung beeinflusst wurde, in der den Tieren Quercetin peroral verabreicht worden war. Nach Verabreichung des Fla-

vonols als wässrige Suspension betrug dessen absolute Bioverfügbarkeit 16 %, in gelöster Form zusammen mit einer Lösung aus Ethanol und Polyethylenglykol jedoch 27 % (KHALED et al. 2003). Daraus ergibt sich, dass die Löslichkeit des lipophilen Quercetins einen deutlichen Einfluss auf Absorption und Bioverfügbarkeit des Flavonols zu haben scheint. Bei zwei weiteren Rattenstudien wurde eine deutlich höhere absolute Bioverfügbarkeit von Quercetin bestimmt, die bei 53 bzw. 59 % lag (CHEN et al. 2005; YANG et al. 2005). In diesen beiden Studien wurde Quercetin oral in einer Hydroxypropyl- β -cyclodextrinlösung bzw. in einer Polyethylenglykollösung verabreicht.

Eine Übersicht über die Bioverfügbarkeit verschiedener Polyphenole aus unterschiedlichen Nahrungsquellen beim Menschen ist bei MANACH et al. (2005) zu finden.

2.4.2 Einfluss des Futters

Wie bereits erwähnt, hat die Art der Zubereitung (Suspension *versus* Lösung), in der das lipophile Quercetin oral verabreicht wird, einen großen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit dieses Flavonols (KHALED et al. 2003). Auch die Art des Futters, mit dem das Flavonol aufgenommen wird, beeinflusst dessen Verfügbarkeit. An Schweinen wurde gezeigt, dass die Verabreichung von Quercetin in einer Testmahlzeit, die aus 30 g Hackfleisch bestand, die Verfügbarkeit gegenüber einer fettarmen stärkeichen Testmahlzeit um 140 % erhöhte (CERMAK et al. 2003). In weiterführenden Untersuchungen stellte sich heraus, dass unter anderem das Fettsäuremuster (LESSER et al. 2006) sowie der Fettanteil von Bedeutung ist. Die Erhöhung des Fettanteils von 3 auf 17 % in einer Testmahlzeit erhöhte die Bioverfügbarkeit von Quercetin signifikant, eine weitere Steigerung auf 32 % brachte jedoch keine weitere Erhöhung (LESSER et al. 2004). Interessanterweise trat der Effekt des Fetts sowohl beim Aglycon selbst als auch bei Verabreichung des hydrophileren Quercetin-3-O-Glucosids Isoquercitrin auf. Die gleiche Beobachtung wurde auch bei Ratten gemacht. Der Fettanteil in der Diät korrelierte auch bei dieser Spezies mit der Bioverfügbarkeit sowohl des Quercetin-Aglycons als auch von Quercetinglucosiden. Der größte Effekt wurde erreicht, wenn die Ratten peroral zusätzlich Lecithin erhielten (AZUMA et al. 2002, 2003). Dies spricht dafür, dass vor allem die Löslichkeit des lipophilen Quercetins (insbe-

sondere dessen Lösung in gemischten Micellen) im Lumen des Darms verbessert und dadurch dessen Absorption erhöht werden konnte. Somit ist der Fettanteil im Futter ein wichtiger Faktor für die Verfügbarkeit von Quercetin aus dem Intestinaltrakt. Daneben scheint auch die Futtermatrix selbst eine Rolle zu spielen, weitere Faktoren im Futter sind jedoch bislang kaum näher spezifiziert worden (SCHOLZ und WILLIAMSON 2007; CERMAK et al. 2009).

Um in der vorliegenden Studie eine möglichst gute orale Bioverfügbarkeit zu erreichen, wurden die Flavonole den Hunden zusammen mit einer kleinen Menge (20 g) eines fett- und proteinreichen Futters vorgelegt. Eine ähnlich zusammengesetzte Testmahlzeit hatte bei Schweinen die Verfügbarkeit positiv beeinflusst (CERMAK et al. 2003).

2.4.3 Einfluss des Glycosylierungsmusters

Wie bereits erwähnt, kommt Quercetin in Pflanzen fast ausschließlich in glycosidischer Form vor. Es ist bekannt, dass die Art des Zuckerrests einen entscheidenden Einfluss auf die Bioverfügbarkeit des Flavonols hat. Das Aglycon von Quercetin sowie Quercetin-Glucoside wie Isoquercitrin (Quercetin-3-O-Glucosid) oder Spiraeosid (Quercetin-4'-O-Glucosid) werden relativ schnell bereits aus den vorderen Segmenten des Dünndarms absorbiert. Dies zeigte sich in mehreren Studien daran, dass die maximalen Blutplasmaspiegel der konjugierten Flavonolmetaboliten (C_{max}) bereits weniger als eine Stunde nach oraler Verabreichung gemessen wurden (MANACH et al. 1997; HOLLMAN et al. 1999; CERMAK et al. 2003). Interessanterweise war die Bioverfügbarkeit des Quercetinglucosids Isoquercitrin bei Schweinen und Ratten zwischen 50 % und 180 % höher als bei einer äquimolaren Menge von Quercetin-Aglycon (MORAND et al. 2000; CERMAK et al. 2003). Die Position der Glucose scheint dabei keinen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit des Flavonols zu haben (OLTHOF et al. 2000). Als mögliche Erklärung für diese Beobachtung wurde diskutiert, dass Quercetinglucoside wie Isoquercitrin und Spiraeosid im Gegensatz zum Aglycon über den intestinalen Natrium-Glucose-Cotransporter SGLT1 absorbiert werden können (HOLLMAN et al. 1995; GEE et al. 2000; CERMAK et al. 2004). Eine Beteiligung des SGLT1 an der Absorption von Quercetinglycosiden konnte jedoch inzwischen ausgeschlossen werden (KOTTRA und DANIEL 2007).

Eine andere Hypothese zur Erklärung der deutlich besseren Quercetinverfügbarkeit aus Quercetinglucosiden gegenüber dem Aglycon vermutet, dass sich die hydrophileren Glucoside aufgrund ihrer besseren Löslichkeit im wässrigen Chymus an der Bürstensaummembran des Dünndarms in höheren Konzentrationen anreichern können, dadurch einen höheren transmembranalen Konzentrationsgradienten aufbauen und somit eine schnellere Absorption ermöglichen (GEE et al. 2000).

Nach gegenwärtigem Kenntnisstand ist eine Hydrolyse der Quercetinglucoside Voraussetzung für die Absorption der dabei freigesetzten Aglyca, die dann aufgrund ihrer hohen Lipophilie wahrscheinlich *per diffusionem* die Bürstensaummembran des Dünndarms passieren können (SAIJA et al. 1995; MOVILEANU et al. 2000; VAN DIJK et al. 2000; CERMAK und WOLFFRAM 2006).

Als entscheidendes Enzym, das an der Bürstensaummembran die β -glycosidische Bindung der Quercetinglucoside Isoquercitrin und Spiraeoside spalten kann, wurde die Lactase-Phloridzin-Hydrolase (LPH; EC 3.2.1.108) identifiziert (IOKU et al. 1998; DAY et al. 2000; SESINK et al. 2003; NÉMETH et al. 2003). Eine Hemmung dieses Enzyms konnte die Absorption von Quercetin aus Isoquercitrin deutlich hemmen (SESINK et al. 2003). Neben der LPH sind auch cytosolische β -Glycosidasen der Enterozyten in der Lage, diese β -glycosidischen Bindung zu spalten (DAY et al. 1998). Diese cytosolischen Enzyme könnten nach Abschilferung der Enterozyten in das Darmlumen die Glycoside ebenfalls hydrolysieren und dadurch die Absorption des freigesetzten Quercetin-Aglycons ermöglichen.

Im Unterschied zu den bereits zitierten Untersuchungen folgert eine an 9 Probanden durchgeführte Studie, dass die Bioverfügbarkeit von Quercetin-Aglycon aus Zwiebeln um 112 % höher sei als aus den Quercetinglucosiden der Zwiebel (WICZKOWSKI et al. 2008).

Im Vergleich zu den genannten Quercetinglucosiden haben andere Quercetinglycoside wie das Rutin (Quercetin-3-O-Glucorhamnosid) eine gegenüber dem Quercetin-Aglycon deutlich verminderte Bioverfügbarkeit bei allen bislang untersuchten Spezies. So betrug die relative orale Bioverfügbarkeit bei Ratten und Schweinen nur etwa 25 % von der des Aglycons (MORAND et al. 2000; CERMAK et al. 2003). Auffällig war hierbei, dass die Absorption von Quercetin aus Rutin deutlich verzögert war. So betrug die Zeit bis zum Erreichen maximaler Plasmaspiegel nach oraler Aufnah-

me (T_{\max}) bei Menschen 6 h (HOLLMAN et al. 1999) und bei Schweinen 3,5 h (CERMAK et al. 2003). Dies spricht für eine Absorption aus den hinteren Darmsegmenten, worauf ebenfalls Versuche an ileostomierten und nichtileostomierten Menschen hinweisen (JAGANATH et al. 2006). In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung konnte gezeigt werden, dass sowohl die LPH als auch cytosolische β -Glucosidasen der Dünndarmenterozyten nicht in der Lage sind, Rutin zu hydrolysieren (DAY et al. 1998; IOKU et al. 1998; DAY et al. 2000; NÉMETH et al. 2003). Daher kann das Quercetin-Aglycon wahrscheinlich erst in den hinteren Darmsegmenten durch die dort vorhandene Aktivität bakterieller Hydrolasen freigesetzt werden. Hierfür notwendige Dickdarmbakterien mit α -Rhamnosidase- und β -Glucosidase-Aktivität für die sequentielle Abspaltung von Rhamnetin und Glucose aus Rutin konnten bereits vor einigen Jahren identifiziert werden (BOKKENHEUSER et al. 1987; KIM et al. 1999). Das freigesetzte Quercetin kann allerdings durch Bakterien nach Ringspaltung weiter abgebaut werden (siehe Kapitel 2.4.5) (SCHNEIDER und BLAUT 2000; BRAUNE et al. 2001). Eine *In-vitro*-Studie, in der Flavonole mit Caecuminhalt von Schlachtschweinen inkubiert wurden, zeigte dass die bakterielle Abbaurate von Quercetin etwa doppelt so hoch wie diejenige von Rutin war (CERMAK et al. 2006). Die Autoren vermuteten, dass ein schnellerer bakterieller Abbau des freigesetzten Quercetins im Vergleich zu einer langsameren Quercetin-Freisetzung aus Rutin dazu führt, dass im Dickdarm der Anteil des für die Absorption verfügbaren Quercetins vermindert wird. Dies könnte die beim Schwein und anderen Spezies beobachtete relativ geringe Bioverfügbarkeit von Quercetin aus Rutin erklären (CERMAK et al. 2006).

2.4.4 Intestinale Absorption und Metabolismus

Da Quercetinglycoside im Darm nicht direkt absorbiert werden können, ist die Abspaltung des Quercetin-Aglycons entweder durch körpereigene Enzyme wie die LPH oder durch bakterielle Hydrolasen für dessen Absorption essentiell. Die Aufnahme des freigesetzten lipophilen Aglycons über die apikale Membran in die Enterozyten erfolgt wahrscheinlich *per diffusionem* (SAIJA et al. 1995; MOBILEANU et al. 2000; VAN DIJK et al. 2000; CERMAK und WOLFFRAM 2006).

Bereits im Darmepithel erfolgt eine intensive Metabolisierung des aufgenommenen Flavonols. So genannte Phase II-Reaktionen stehen bei den meisten Spezies im Vordergrund und es kommt durch diese Konjugationsreaktionen vor allem zu Glucuronidierungen, Sulfatierungen und Methylierungsreaktionen. Flavonole und insbesondere Quercetin bieten aufgrund der vielen Hydroxylgruppen zahlreiche Möglichkeiten für Konjugationen. Die dafür notwendigen UDP-Glucuronosyltransferasen, Sulfotransferasen und Catechol-O-Methyltransferasen (COMT) sind im Darmepithel nachgewiesen worden (PISKULA und TERA0 1998; CHENG et al. 1998, 1999; RADOMINSKA-PANDYA et al. 1998; SPENCER et al. 1999; KUHNLE et al. 2000; DE SANTI et al. 2000b; CHEN et al. 2003). Durch Methylierung an Position 3' des B-Rings entsteht Isorhamnetin, erfolgt die Methylierung hingegen an Position 4' entsteht Tamarixetin. Diese methylierten Derivate des Quercetins können wie auch das Quercetin selbst weiter glucuronidiert und/ oder sulfatiert werden. Nach Inkubation humaner Dünndarm-Mikrosomen mit Quercetin wurde das Flavonol an der 3-, 7-, 3'- und 4'-Position glucuronidiert (BOERSMA et al. 2002). Ein großer Teil dieser konjugierten Metaboliten wird über die Bürstensaummembran wieder in das Darmlumen reseziert und gelangt anschließend in den Dickdarm (CRESPY et al. 1999). Diese intestinale Resekretion erfolgt über spezifische Transportmechanismen. Hierbei spielen *ATP-binding-cassette*-Transportproteine eine entscheidende Rolle, insbesondere das in der Bürstensaummembran exprimierte BCRP (SESINK et al. 2005). Nach einer Untersuchung an Ratten werden ca. 80 % des ursprünglich von den Enterozyten aufgenommenen Quercetins in konjugierter Form wieder in den Darm reseziert, nur 20 % werden von den Darmzellen in das Pfortaderblut abgegeben (CRESPY et al. 2003). Die auf der basolateralen Seite der Enterozyten beteiligten Transportmechanismen konnten allerdings bislang noch nicht identifiziert werden. Hierbei scheinen die Enterozyten ausschließlich konjugierte Quercetinmetaboliten in das Pfortaderblut abzugeben. Bei Schweinen wurden nach einer Quercetin-angereicherten Mahlzeit im Pfortaderblut ausschließlich konjugierte Flavonolmetaboliten, jedoch keine freien Quercetin-Aglyca nachgewiesen (CERMAK et al. 2003). Es kann nach gegenwärtigem Kenntnisstand jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass sehr hohe Quercetindosierungen die Konjugationskapazität des Dünndarms erschöpfen und in diesen Fällen auch Quercetin-Aglyca in das Pfortaderblut übertreten könnten.

Über die Pfortader erreichen die absorbierten Flavonolkonjugate die Leber und werden von den Hepatozyten aufgenommen. Nach Angaben von O'LEARY et al. (2003) kann die Aufnahme über das in der sinusoidalen Hepatozytenmembran exprimierte Transportprotein OATP2 (*Organic Anion Transporting Polypeptide 2*) erfolgen. In den Hepatozyten können die Quercetinkonjugate durch dort vorkommende Glucuronidasen bzw. Sulfatasen hydrolysiert und anschließend erneut glucuronidiert, sulfatiert und/oder methyliert werden (ZHU et al. 1994; O'LEARY et al. 2001; BOERSMA et al. 2002; DE SANTI et al. 2002; O'LEARY et al. 2003; WILLIAMSON et al. 2005). Ein großer Teil der in der Leber gebildeten Metaboliten wird anschließend in die Galle sezerniert (MANACH et al. 1996b; CRESPIY et al. 1999). Bei Ratten scheinen über 40 % der in das Pfortaderblut gelangenden Flavonole mit der Galle sezerniert zu werden, so dass unter Berücksichtigung der bereits enteral sezernierten Flavonole höchstens etwa 10 % einer oral verabreichten Quercetindosis den zentralen Blutkreislauf erreichen (CRESPIY et al. 2003).

Konjugierte Quercetinmetaboliten sind auch in der Lymphe des Ductus thoracicus nachgewiesen worden (MUROTA und TERAOKA 2005). Diese können unter Umgehung der Leber direkt in den zentralen Kreislauf gelangen. Über die quantitative Bedeutung dieses Absorptionsweges gibt es jedoch noch keine weiteren Kenntnisse.

Hinsichtlich der quantitativen Bedeutung der jeweiligen Stoffwechselreaktionen bestehen deutliche Speziesunterschiede, was insbesondere für die Methylierungsreaktionen mehrfach gezeigt werden konnte. So tragen bei Ratten die meisten Plasmametaboliten von Quercetin eine Methylgruppe (MANACH et al. 1996b; MORAND et al. 1998; MULLEN et al. 2002), während bei Menschen wie auch bei Schweinen die methylierten Quercetinderivate Isorhamnetin und Tamarixetin nur einen maximalen Anteil von zusammen etwa 20-25 % ausmachen (ERLUND et al. 2000; ADER et al. 2000; OLTHOF et al. 2000; GRAEFE et al. 2001; CERMAK et al. 2003; HUBBARD et al. 2003; LESSER et al. 2004).

Mit Hilfe der Massenspektrometrie konnte in den letzten Jahren die Struktur einiger Plasmametaboliten nach oraler Aufnahme von Quercetin oder von Quercetinglykosiden in Menschen und Ratten aufgeklärt werden. Bei Menschen wurden im Blut vor allem Quercetin-3-Glucuronid, Isorhamnetin-3-Glucuronid, Quercetin-3'-Sulfat sowie ein nicht näher bestimmtes Quercetin-Diglucuronid und ein Sulfoglucuronid von Quercetin nachgewiesen. In geringeren Anteilen fanden sich noch weitere konjugier-

te Metaboliten, bei denen die genaue Position der konjugierten Gruppen nicht genau bestimmt werden konnte (MULLEN et al. 2004; JAGANATH et al. 2006; MULLEN et al. 2006). Im Plasma von Ratten wurden ebenfalls mehrere verschiedene Glucuronide, Sulfate und Sulfoglucuronide gefunden, wobei die Metaboliten mit Methylgruppe diejenigen ohne eine solche mengenmäßig deutlich übertrafen (MULLEN et al. 2002; GRAF et al. 2005b).

Einerseits unterliegt Quercetin als Xenobiotikum der Umsetzung durch Enzyme des Fremdstoffwechsels, ist aber andererseits auch selbst in der Lage die Expression entsprechender Enzyme zu verändern. So wurde gezeigt, dass Quercetin in einer humanen Colonkarzinomzelllinie (Caco-2) die Proteinexpression sowohl der UDP-Glucuronosyltransferase-Isoform 1A6 sowie des ABC-Transportproteins MRP2 steigern konnte (BOCK et al. 2000). Zytosolische Sulfotransferase-Isoformen (SULT), welche für den Arzneistoffwechsel relevant sind, werden insbesondere durch Quercetin und teilweise auch durch Kämpferol unterschiedlich stark inhibiert (EATON et al. 1996; OTAKE et al. 2000; DE SANTI et al. 2000a; HARRIS et al. 2004).

Auch *in vivo* konnten ähnliche Effekte beobachtet werden. Eine zweiwöchige Fütterung von Ratten mit Quercetin in einer Konzentration von 1 % (w/w) in der Diät führte zu einer deutlichen Erhöhung der UDP-Glucuronosyltransferase-Aktivität im Darmepithel und in der Leber; dies war im distalen Dünndarm und der Leber signifikant (VAN DER LOGT et al. 2003). Bereits nach wenigen Stunden führte eine *In-vivo*-Perfusion des Dünndarms von Freiwilligen mit einer Quercetin-haltigen Lösung in deren Enterozyten zu einer erhöhten mRNA-Expression der Phase II-Enzyme UDP-Glucuronosyltransferase 1A1 und Glutathion-S-Transferase (PETRI et al. 2003).

2.4.5 Einfluss der intestinalen Mikroflora

Wie bereits in Kapitel 2.4.3 erwähnt, unterliegen die in den Dickdarm gelangenden nicht zuvor absorbierten Quercetinglycoside wie auch die in den Darm resezierten Quercetinkonjugate einem weiteren Abbau durch die Dickdarmflora. Als erster Schritt erfolgt die Abspaltung des Zuckerrestes. So können beispielsweise Rutin und Isoquercitrin durch verschiedene Stämme von *Bacteroides spp.*, *Fusobacterium spp.* beziehungsweise *Eubacterium ramulus* oder *Enterococcus casseliflavus* hydrolysiert werden (BOKKENHEUSER et al. 1987; SCHNEIDER et al. 1999; KIM et al. 1999).

Das freigesetzte Quercetin kann dann nach Spaltung des C-Rings weiter zu einfacheren Phenolsäuren abgebaut werden. Als bakterielle Abbauprodukte wurden beispielsweise 4-Hydroxybenzoesäure, 3,4-Dihydroxybenzoesäure, 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure, 3-Hydroxyphenylelessigsäure oder Phloroglucinol und kurzkettige Fettsäuren wie Essigsäure und Buttersäure nachgewiesen (KIM et al. 1998, 1999; BLAUT et al. 2003; RECHNER et al. 2004; LABIB et al. 2004). Diese bakteriellen Metaboliten können ebenfalls im Dickdarm absorbiert werden. Daher steigen nach einer flavonoidreichen Mahlzeit die Plasmakonzentrationen dieser Phenolsäuren und ihrer Konjugate wie beispielsweise Hippursäure deutlich an (OLTHOF et al. 2003).

2.4.6 Bindung an Plasmaproteine

Flavonoide und ihre Metaboliten sind im Blut zum größten Teil an Plasmaproteine gebunden. *In-vitro*-Versuche zeigten, dass das Quercetin-Aglycon zu ca. 99 % an Serumalbumin gebunden wird und eine Kopplung an andere Plasmaproteine und Lipoproteine nur von untergeordneter Bedeutung ist (BOULTON et al. 1998; SENGUPTA und SENGUPTA 2002; ZSILA et al. 2003). Auch nach oraler Quercetinaufnahme aus unterschiedlichen Quercetinglycosiden sind die im Plasma zirkulierenden Flavonolkonjugate wahrscheinlich vorwiegend an Albumin gebunden, obwohl deren Affinität zu Albumin verglichen mit dem Aglycon um eine Größenordnung geringer ist (DUFOUR und DANGLES 2005). FIORANI et al. (2003) vermuteten, dass die Verfügbarkeit von Quercetin beim Menschen durch die Bindung von Quercetin an das Hämoglobin menschlicher Erythrozyten beeinflusst werden könnte. Allerdings konnten mehrere Untersuchungen an Ratten nach Fütterung mit ^{14}C -markiertem Quercetin-4'-glucosid praktisch keine ^{14}C -Aktivität in den Erythrozyten feststellen, wohingegen im Blutplasma die Aktivität deutlich erhöht war (MULLEN et al. 2002; GRAF et al. 2005b).

2.4.7 Gewebeverteilung

Bereits vor fast 30 Jahren publizierten UENO et al. (1983) Untersuchungsergebnisse über die Gewebeverteilung von ^{14}C -Quercetin bei Ratten sechs Stunden nach oraler Verabreichung. Zu diesem Zeitpunkt befand sich weniger als 1 % der Gesamtdosis, gemessen als radioaktive Aktivität, in Körpergeweben außerhalb des Gastrointestinaltrakts. Unter diesen hatten Leber und Nieren mit etwa 0,2 % der Gesamtdosis noch die höchste Konzentration, während der Anteil in den weiteren untersuchten Organen (Lunge, Skelettmuskulatur, Herz) jeweils unter 0,1 % lag.

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch spätere Untersuchungen, in denen Ratten ^{14}C -markiertes Quercetin-4'-Glucosid gefüttert wurde (MULLEN et al. 2002, 2008; GRAF et al. 2005b). Über einen Zeitraum bis zu 5 Stunden nach Aufnahme des Glucosids befanden sich über 90 % der Gesamtdosis im Gastrointestinaltrakt (GRAF et al. 2005b). Unter den extraintestinalen Geweben wiesen Blutplasma sowie Leber und Nieren die höchsten Anteile an der applizierten Gesamtdosis auf. Außerhalb des Intestinaltrakts konnte hierbei kaum freies Quercetin nachgewiesen werden, mit Ausnahme von geringen Mengen in Leber und Nieren. Stattdessen wurden fast ausschließlich methylierte, glucuronidierte und sulfatierte Quercetinmetaboliten gefunden (MULLEN et al. 2002 und 2008; GRAF et al. 2005b).

Im Unterschied zu diesen Versuchen, in denen den Tieren eine einmalige Flavonoldosis verabreicht worden war, erhielten in den Studien von DE BOER et al. (2005) und BIEGER et al. (2008) Ratten bzw. Schweine ein mit Quercetin angereichertes Futter über einen Zeitraum von 11 bzw. 4 Wochen. In diesen Studien wurde nach Ablauf der Fütterungsperiode die Flavonolkonzentration in verschiedenen Körpergeweben bestimmt. Bei den Rattenversuchen wurde das Futter mit zwei verschiedenen Quercetin-Konzentrationen supplementiert: 0,1 % (entsprach einer täglichen Quercetin-Aufnahme von etwa 50 mg/kg KM) und 1 % (entsprach einer täglichen Quercetin-Aufnahme von etwa 500 mg/kg KM). Wesentliches Ergebnis dieser Studie war, dass bei beiden Dosierungen die höchsten Gesamtflavonolkonzentrationen jeweils im Blutplasma gemessen wurden, der Gastrointestinaltrakt wurde hierbei nicht untersucht. Die höchsten Gewebekonzentrationen fanden sich in Lunge, Hoden, Niere, Herz und Leber, diese lagen aber um eine Größenordnung niedriger als im Blut. Die zehnfach höhere Dosierung führte nur zu etwa vierfach höheren Flavonolkonzentra-

tionen in den verschiedenen Geweben (DE BOER et al. 2005). In einer ähnlichen Studie wurde ein mit Quercetin angereichertes Futter über einen Zeitraum von 4 Wochen an Schweine verfüttert (BIEGER et al. 2008). Diese Tiere nahmen dabei täglich 50 mg Quercetin/kg KM, verteilt auf 2 Mahlzeiten, auf. Die höchsten Gesamtflavonolkonzentrationen fanden sich nach Abschluss des Versuchs im Dick- und Dünndarm sowie in Niere und Leber. In all diesen Geweben waren die Konzentrationen sogar höher als im Blutplasma. In allen anderen untersuchten Geweben, wie Lunge, Muskulatur, Fettgewebe und Hirn, waren die Flavonolkonzentrationen deutlich niedriger als im Blut. Einige Schweine erhielten die gleiche Quercetindosis nur ein einziges Mal vor der Organentnahme. Im Vergleich zu dieser einmaligen Quercetingabe konnte auch nach der vierwöchigen Fütterungsperiode keine Akkumulation von Quercetin und seinen Flavonolmetaboliten in den nichtexkretorischen Geweben sowie im Blutplasma nachgewiesen werden. Die Autoren dieser Studie erklärten diesen Befund mit der relativ kurzen Plasmahalbwertszeit der Metaboliten (BIEGER et al. 2008).

2.4.8 Exkretion

Wie bereits in Kapitel 2.4.4 erwähnt, wird ein großer Teil des von den Enterozyten absorbierten Quercetins in konjugierter Form bereits im Darm reseziert oder über die Galle ausgeschieden (CRESPY et al. 1999, 2003). Dementsprechend werden vergleichsweise hohe Flavonolkonzentrationen im Darmtrakt und in der Leber gemessen (DE BOER et al. 2005; BIEGER et al. 2008). Die in den Dünndarm resezierten Flavonolkonjugate erreichen den Dickdarm und können dort, wie in Kapitel 2.4.5 beschrieben, durch die Dickdarmflora weiter abgebaut werden. Die entstehenden bakteriellen Metaboliten werden teilweise absorbiert, teilweise mit den Fäzes ausgeschieden (OLTHOF et al. 2003; MULLEN et al. 2008). Daneben spielt die renale Exkretion eine wichtige Rolle. Im Urin wurden deutlich mehr verschiedene Metaboliten nachgewiesen als im Blutplasma (JAGANATH et al. 2006; MULLEN et al. 2006, 2008). Dies deutet auf darauf hin, dass auch das Nierenepithel Flavonole intensiv verstoffwechselt. Wie bereits erwähnt, wurden auch im Nierengewebe vergleichsweise hohe Flavonolkonzentrationen gefunden (DE BOER et al. 2005; BIEGER et al. 2008). Die über 24 Stunden kumulativ mit dem Harn ausgeschiedene Fraktion von

Quercetinmetaboliten betrug bei Menschen etwa 5 % der mit einer Testmahlzeit aufgenommenen Quercetinmenge (GRAEFE et al. 2001; MULLEN et al. 2006).

Ein bedeutender Teil des oral aufgenommenen Quercetins scheint allerdings nicht über Galle, Fäzes oder den Urin ausgeschieden zu werden. Insbesondere die im Dickdarm durch bakterielle Hydrolyse und Ringspaltung entstandenen und anschließend absorbierten Metaboliten (siehe Kapitel 2.4.5) scheinen teilweise weiter bis zur Stufe des Kohlendioxids abgebaut zu werden. So konnten in einer Studie mit Freiwilligen zwischen 23 und 81 % einer ^{14}C -markierten oralen Quercetindosis über einen Zeitraum von 72 h als CO_2 in der Expirationsluft wiedergefunden werden (WALLE et al. 2001).

2.5 Zielsetzung

Gegenwärtig liegen zu Stoffwechsel und Bioverfügbarkeit von Quercetin vor allem Erkenntnisse aus Untersuchungen mit Menschen, Ratten und Schweinen vor. Wie auch vom Stoffwechsel anderer Xenobiotika bekannt, kommen hierbei deutliche Speziesunterschiede vor. Da bislang noch keinerlei Daten zur Bioverfügbarkeit von Quercetin bei Hunden vorliegen, macht dies Untersuchungen bei dieser Spezies erforderlich.

Mit der vorliegenden Untersuchung sollten daher absolute Bioverfügbarkeit und Pharmakokinetik dieses Flavonols bestimmt werden. Ein Schwerpunkt lag dabei auf dem Einfluss des Glycosylierungsmusters häufig vorkommender Quercetinglycoside, da Futtermitteln häufiger natürlich vorkommende Quercetinglycoside und seltener das Aglycon selbst zugesetzt werden.

3 Tiere, Material und Methoden

3.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Als Versuchstiere dienten neun Beagles im Alter von sechs Jahren, die als Versuchshunde im Institut für Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität gehalten wurden. Es handelte sich dabei um drei männliche kastrierte Tiere mit einer Körpermasse (KM) von 13,5 bis 17,2 kg sowie sechs weibliche Tiere mit einer KM von 10,2 bis 15,9 kg. Die durchschnittliche KM aller Hunde betrug $13,5 \text{ kg} \pm 1,7 \text{ kg}$ (Mittelwerte der Einzeltiere \pm Standardabweichung). Die Haltung erfolgte in Dreier- bzw. Vierergruppen nach Geschlechtern getrennt. Jeder Zwinger bestand aus einem 3,2 bis 6,5 m² großen Innenraum, und einem 10,3 bis 15,1 m² großen Außengehege, zwischen denen die Tiere beliebig durch eine Klappenöffnung hin- und herwechseln konnten. Außerdem erhielten die Tiere mindestens einmal täglich gemeinsamen Auslauf mit dem insgesamt 12 Hunde umfassenden Rudel in einem größeren Außenauslauf und wurden gelegentlich an der Leine ausgeführt. Im Innenraumabteil hatte jeder Hund eine Liegematte aus Schaumstoff und *ad libitum* Zugang zu einem Wassernapf mit Trinkwasser.

Die Hunde erhielten einmal täglich morgens Trockenfutter gemischt aus zwei kommerziellen Alleinfuttermitteln für Hunde, („Getreideflocken und Fleisch“ und „Krokettenvollnahrung“, Fa. Royal Canin Tiernahrung, Köln). Die Ergebnisse der Rohnährstoffanalyse dieser Futtermittel sind in Tabelle 1 angegeben. Die Rohnährstoffanalyse erfolgte im Institut für Tierernährung und Stoffwechselphysiologie der Christian-Albrechts-Universität Kiel.

Tabelle 1: Rohnährstoffanalyse der Standarddiät (TM = Trockenmasse)

	% TM	% Roh- asche in der TM	% Rohprotein in der TM	% Rohfett in der TM	% Roh- faser in der TM
Getreideflocken und Fleisch	92,2	6,7	26,4	11,7	5,5
Kroketten Voll- nahrung	93,1	7,3	26,9	10,7	4,9

Die Fütterung erfolgte, je nach Verträglichkeit der Hunde untereinander, einzeln oder in der Zwingergruppe. Bei einzelnen Tieren wurden Gewichtsschwankungen von bis zu 1,4 kg (8 % der Körpermasse) innerhalb eines Zeitraumes von 1,5 Monaten beobachtet, für die keine klinisch relevanten Ursachen erkennbar waren.

3.2 Verwendete Flavonole

Die oral verabreichten Flavonole Quercetin Dihydrat, Rutin (Quercetin-3-O-Glucorhamnosid) und Isoquercitrin (Quercetin-3-O-Glucosid) wurden von der Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, bezogen. Nach Herstellerangaben wiesen die Substanzen eine Reinheit von > 98,5 % auf. Die Flavonole wurden zusammen mit einem kommerziellen, flavonolfreien Feuchtfutter (Marke „Premium Spurty mit zartem Geflügel“, Penny Markt GmbH, Köln) verabreicht.

Die Ergebnisse der Rohrnährstoffanalyse dieses Futtermittels sind in Tabelle 2 angegeben. Die Rohrnährstoffanalyse erfolgte im Institut für Tierernährung und Stoffwechselphysiologie der Christian-Albrechts-Universität Kiel.

Tabelle 2: Rohrnährstoffanalyse des Futtermittels für die Testmahlzeit
(TM = Trockenmasse)

	% TM	% Rohasche in der TM	% Rohprotein in der TM	% Rohfett in der TM	% Rohfaser in der TM
Dinner Geflügel Spurty	18,8	8,6	52,7	29,5	2,7

Das für die intravenöse Injektion verwendete Quercetin Dihydrat wurde in Dimethylsulfoxid (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) gelöst und direkt vor der Applikation steril filtriert (Minisart-RC-4-Sterilfilter, Porengröße 0,2 µm, Sartorius AG, Göttingen).

Für die Validierung der verwendeten HPLC-Methode sowie für die Standards bei der Probenanalyse wurden folgende Flavonoide eingesetzt (alle Substanzen von Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe):

- Rhamnetin Rotichrom® HPLC Grade (≥ 99 %)
- Isorhamnetin Rotichrom® HPLC Grade (≥ 99 %)
- Quercetin Rotichrom® HPLC Grade (> 99 %)

- Kämpferol Rotichrom® HPLC Grade (> 99 %)
- Tamarixetin Rotichrom® HPLC Grade (≥ 99 %)

3.3 Durchführung des Tierversuchs

Alle im Folgenden beschriebenen Versuche waren vom Regierungspräsidium Leipzig als zuständiger Behörde genehmigt worden (Aktenzeichen 24-9168.11 TVV 15/06).

3.3.1 Allgemeine Durchführung der Versuche

Den neun Hunden wurden in mehreren Versuchsdurchgängen Flavonole oral bzw. intravenös verabreicht. Die verschiedenen Behandlungen in jedem dieser Versuchsdurchgänge waren in Form eines Lateinischen Quadrats angeordnet. Somit erhielt jeder in einem Versuchsdurchgang verwendete Hund auch jede Behandlung. Bei Versuchsdurchgängen mit 2 verschiedenen Applikationen wurden die Hunde in 2 Gruppen mit 4 bzw. 5 Tieren aufgeteilt, bei einem Versuchsdurchgang mit 3 verschiedenen Applikationen in 3 Gruppen mit jeweils 3 Tieren. Dabei wurde auf eine gleichmäßige Geschlechterverteilung in den Versuchsgruppen geachtet.

Zwischen den einzelnen Behandlungen eines Versuchsdurchgangs lag ein Abstand von ein bis zwei Wochen, um den Hunden genügend Erholungszeit zwischen den Blutentnahmen zu geben. Der Zeitraum zwischen den verschiedenen Versuchsdurchgängen betrug mindestens 2 Monate, um Folgen einer eventuellen Induktion von Stoffwechselenzymen durch die vorhergehende Flavonolverabreichung auszuschließen. Die für eine Behandlung vorgesehenen Hunde wurden jeweils am Vortag gewogen, um die zu verabreichende Flavonoldosis individuell auf die aktuelle Körpermasse einstellen zu können.

Am Morgen des Behandlungstages wurden die Tiere nicht gefüttert, so dass sie bei Versuchsbeginn etwa 24 Stunden genüchtert waren. Vor jeder Behandlung wurden sie einer Allgemeinuntersuchung unterzogen und nur klinisch unauffällige Hunde in den Versuch einbezogen. Direkt vor der Flavonolaufnahme fand eine Blutentnahme statt („Nullwert“). Im Anschluss an die Verabreichung des Flavonols wurde den Tieren zu den folgenden Zeitpunkten Blut entnommen: nach 15, 30, 45, 60, 90, 120 und 150 Minuten sowie nach 3, 4, 6, 12 und 24 Stunden. Somit wurde bei jeder Behand-

lung an insgesamt 13 Zeitpunkten Blut entnommen. Im letzten Versuchsdurchgang fanden Blutentnahmen auch nach 36, 48 und 72 Stunden statt; um die Zahl der Blutentnahmen und damit die Gesamtmenge des entnommenen Blutes nicht zu erhöhen, wurde dafür auf die Entnahme nach 45, 90 und 150 Minuten verzichtet.

Um die Tiere auch an den Versuchstagen zwischen den Blutentnahmen frei beweglich in ihren gewohnten Gruppen halten zu können und dadurch die versuchsbedingte Stressbelastung zu minimieren, wurde auf einen Dauerkatheter verzichtet. Stattdessen wurde zu den jeweiligen Zeitpunkten das Blut durch Einzelpunktionen mittels 20G-Kanülen (Sterican®, B. Braun AG, Melsungen) alternierend an den Venen aller 4 Gliedmaßen (*Vv. cephalicae antebrachii*, *Vv. saphenae*) gewonnen. Pro Entnahmezeitpunkt wurden 3 bis 4 ml Blut in einem Probenröhrchen mit Lithium-Heparin (präparierte Probenröhrchen, 4 ml, mit Lithium-Heparin, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht; Art.-Nr. 371 105, Fa. HEILAND VET, Hamburg) aufgefangen und bei 4°C maximal 30 Minuten gelagert. Anschließend erfolgte die Gewinnung des Blutplasmas mittels Zentrifugation bei 1400 g für 10 Minuten bei 4°C. Das Plasma wurde entnommen, aliquotiert und in Reagiergefäßen (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) bei -20°C eingefroren. Spätestens nach 24 Stunden erfolgte die Verlagerung der Proben in einen -80°C-Gefrierschrank, wo sie bis zur Analyse gelagert wurden.

In den ersten 4 Stunden nach Flavonolverabreichung erhielten die Hunde kein Futter und blieben unter ständiger Beobachtung. Wasser stand ihnen während des gesamten Zeitraums zur *Ad-libitum*-Aufnahme zur Verfügung. Nach der 4h-Blutentnahme erhielten die Tiere ihre übliche Futterration, dabei nahmen sie in der Regel auch erstmals Wasser auf. Anschließend wurden sie wieder in ihren Zwinger verbracht und nur zu den angegebenen späteren Entnahmezeitpunkten aufgesucht. Die 24h-Entnahme sowie die 48h- und 72h-Entnahmen des letzten Versuchsdurchgangs fanden jeweils vor der morgendlichen Fütterung statt.

3.3.2 Bioverfügbarkeit von Quercetin und Rutin (je 30 mg/kg KM)

In diesem Versuchsdurchgang sollte geklärt werden, ob die in Hundefuttermitteln am häufigsten zu findenden Flavonole Quercetin und sein Glucorhamnosid Rutin in einem ausreichenden Maß absorbiert werden, um pharmakokinetische Parameter berechnen zu können. Da bei dieser Spezies noch keinerlei Erfahrungen über zu erwar-

tende Plasmaspiegel vorlagen, wurde zunächst eine vergleichsweise hohe Dosierung von 30 mg Quercetin bzw. Rutin pro kg KM gewählt. Die beiden Flavonole wurden mit einwöchigem Abstand bei allen Tieren nach der Versuchsanordnung eines Lateinischen Quadrats oral verabreicht.

Dazu wurde die jeweilige Gesamtdosis (für jeden Hund individuell abgewogen) in eine Portion von 30 g des kommerziellen Feuchtfutters verbracht, die in einen Futternapf gegeben und den Hunden einzeln vorgesetzt wurde. Im Moment der ersten Futteraufnahme startete die Zeitmessung für die folgenden Blutentnahmen. Die Futterportion mit der Flavonoldosis wurde in der Regel innerhalb weniger Sekunden vollständig aufgenommen. In Einzelfällen dauerte die Aufnahme der Futterportion länger, war jedoch immer innerhalb von 5 Minuten abgeschlossen. Anhand der intensiv gelben Farbe der Flavonole konnte im Napf visuell kontrolliert werden, ob die gesamte Flavonoldosis tatsächlich aufgenommen worden war. In den wenigen Einzelfällen, wo dies nicht zweifelsfrei nachzuweisen war, wurden die betreffenden Hunde aus dem laufenden Versuch ausgeschlossen und die Behandlung frühestens eine Woche später wiederholt. Dieselbe Vorgehensweise wurde auch bei allen weiteren oralen Verabreichungen gewählt.

3.3.3 Absolute Bioverfügbarkeit von Quercetin

In diesem Versuchsdurchgang sollte die absolute Bioverfügbarkeit des Flavonols Quercetin bestimmt werden. Dazu wurde den Hunden Quercetin intravenös in einer Konzentration von 0,5 mg/kg KM und oral in einer Konzentration von 10 mg/kg KM verabreicht. Die orale Gabe erfolgte auf die gleiche Weise wie im 1. Versuchsdurchgang (siehe Kapitel 3.3.2). Alle Hunde erhielten die zwei verschiedenen Verabreichungen nach dem Prinzip eines Lateinischen Quadrats mit einwöchigem Abstand zwischen beiden Applikationen.

Für die intravenöse Gabe wurde das Flavonol kurz vor Verabreichung in Dimethylsulfoxid in einer Konzentration von 12,5 mg/ml gelöst und steril filtriert (Minisart-RC-4-Sterilfilter, Porengröße 0,2 µm, Sartorius AG, Göttingen). Die Dosis von 0,5 mg/kg KM entsprach im Filtrat einem Injektionsvolumen von 40 µl/kg KM. Die finale Quercetinkonzentration wurde in einem Aliquot des Filtrats nach dem Versuch mit der in Abschnitt 3.5 beschriebenen Analyseverfahren überprüft. Das entsprechende Filtratvo-

lumen wurde in die *Vena cephalica antebrachii* injiziert, wobei darauf geachtet wurde, dass für die erste Blutentnahme 15 Minuten nach dieser Injektion die Vene einer anderen Gliedmaße verwendet wurde.

3.3.4 Relative Bioverfügbarkeit verschiedener Quercetinglycoside

In diesem Versuchsdurchgang sollte die relative orale Bioverfügbarkeit von Quercetin und den beiden Quercetinglycosiden Rutin und Isoquercitrin bestimmt werden. Das Versuchsdesign entsprach einem Lateinischen Quadrat mit $n = 3$ mit der Einschränkung, dass aus Kostengründen nur 7 Tiere Isoquercitrin erhielten. Die verabreichte Menge war so gewählt, dass die Hunde eine jeweils isomolare Dosis von 30 $\mu\text{mol/kg}$ KM erhielten. Dies entsprach einer Dosierung von 10 mg Quercetin, 14 mg Isoquercitrin bzw. 20 mg Rutin pro kg KM.

3.4 Probenaufarbeitung

Für die Bestimmung der Flavonole mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) mussten diese zuvor aus dem Plasma extrahiert werden. Die Extraktion erfolgte in Anlehnung an die Methode von MORAND et al. (1998).

Die Plasmaproben wurden direkt nach dem Auftauen bei Raumtemperatur für 4 Minuten bei 2000 x g zentrifugiert und anschließend 490 μl Plasma abpipettiert. Dieses Plasmavolumen wurde mit 490 μl 0,9%iger Natriumchloridlösung auf das doppelte Volumen gebracht. Jeder Probe wurden 30 μg Rhamnetin (gelöst in 10 μl Methanol) als interner Standard zugesetzt.

Die Flavonole wurden mittels HPLC mit anschließender Nachsäulenderivatisierung und Fluoreszenzdetektion (HOLLMAN et al. 1996) bestimmt (siehe Kapitel 3.5). Für diesen hochsensitiven Nachweis mittels Fluoreszenzdetektion sind durch Nachsäulenderivatisierung gebildete Aluminium-Flavonol-Komplexe essentiell. Da diese Reaktion eine freie OH-Gruppe am C3-Atom der Flavonole erfordert, mussten alle im Blutplasma vorliegenden konjugierten Flavonolmetaboliten (Glucuronide, Sulfate) zuvor hydrolysiert werden. Aus diesem Grund wurden die Proben direkt nach Zugabe des internen Standards mit einem Enzymgemisch aus β -Glucuronidase/Sulfatase

inkubiert. Das Enzymgemisch wurde in einem Volumen von 150 µl Wasser pro Probe zugegeben. Weiterhin wurden jeder Probe 75 µl einer 0,583molaren Essigsäurelösung zugesetzt, um den pH-Wert für die Aktivität der Enzyme zu optimieren (Optimum zwischen pH-Wert 4,5 und 6). Im Verlauf der Analyse wurden 2 verschiedene Enzymchargen eingesetzt, in Vorversuchen wurde jeweils die optimale Konzentration für jede Charge ermittelt (1. Charge: 7 Einheiten/µl Plasma; 2. Charge: 13 Einheiten/µl Plasma). Die Inkubation der Proben erfolgte anschließend im abgedunkelten Schüttelwasserbad über 50 Minuten bei 37°C. Diese Bedingungen hatten sich in Vorversuchen als optimal für die enzymatische Hydrolyse der Konjugate herausgestellt. Ein Teil der aliquotierten Proben wurde nur mit Wasser ohne Enzymgemisch inkubiert, um den Anteil der im Plasma vorliegenden nicht-konjugierten Flavonole, der sogenannten freien Aglyca, zu bestimmen.

Die Inkubation wurde durch Zugabe von 2 ml Aceton zu jeder Probe beendet, um alle Eiweißbestandteile zu denaturieren und auszufällen sowie die Flavonole zu extrahieren. Dazu wurden die Proben nach der Acetonzugabe kurz intensiv gemischt (Vortex) und für 20 Minuten auf einem Horizontalschüttler unter Lichtschutz bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurden sie in einer vorgekühlten Zentrifuge für 45 Minuten bei 4200 x g und 4°C zentrifugiert.

Der flavonolhaltige Überstand wurde in SpeedVac®-Röhrchen dekantiert und in einem Rotations-Vakuumkonzentrator eingetrocknet (SpeedVac® Savant SPD131DDA, Thermo Electron Corporation, Dreieich). In Vorversuchen hatte sich eine Trocknung in zwei Phasen als optimal herausgestellt, um mögliche Verluste durch Verspritzen infolge von Siedeverzugsreaktionen des acetotropen Gemisches zu vermeiden. In der ersten Phase wurde das Probenvolumen für ca. 45 bis 60 Minuten bei der minimal möglichen Vakuumeinstellung von 2,7 kPa ohne Wärmezufuhr auf ca. 1,1 ml reduziert. Danach wurden die Proben unter maximal möglichem Vakuum (ca. 1,3 Pa) bei einer Temperatur von 45°C über weitere zwei bis drei Stunden vollständig eingetrocknet.

Das verbliebene kristalline Pellet wurde anschließend in 200 µl Methanol aufgenommen, für 30 Sekunden bei maximaler Stufe auf einem Vortex-Gerät geschüttelt und danach für 15 Minuten in ein Ultraschallbad gestellt. Anschließend wurden zu jeder Probe 77,5 µl Wasser und 22,5 µl 32%ige HCl-Lösung pipettiert. Die dadurch erfolgte Ansäuerung diente der besseren chromatographischen Trennung der Isomere

Isorhamnetin und Tamarixetin. Nach kurzem Schütteln auf einem Vortex-Gerät mit mittlerer Stufe wurde das Gemisch in Eppendorf-Cups überführt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur und 10.000 x g zentrifugiert. Von dem Überstand wurden je 210 µl in HPLC-Vials pipettiert und zur Analyse in den auf 4°C gekühlten Autosampler der HPLC-Anlage gegeben.

Da das verwendete Enzymgemisch eine geringe Kontamination mit Quercetin und Kämpferol aufwies, wurde bei jeder Analyse von Versuchsproben, die mit β -Glucuronidase/Sulfatase inkubiert wurden, auch ein mit demselben Enzymgemisch versetzter flavonolfreier Leerplasma-Ansatz analysiert. Die Analysenwerte in den Versuchsproben wurden anschließend um die in diesem Ansatz bestimmte Konzentration der beiden Flavonole korrigiert.

3.5 HPLC

Die chromatographische Trennung und Analyse der Flavonole in den aufgearbeiteten Plasmaproben erfolgte nach der leicht modifizierten Methode von HOLLMAN et al. (1996) durch HPLC mit anschließender Nachsäulenderivatisierung und Fluoreszenzdetektion. Dabei wird die hochsensitive Fluoreszenzdetektion der Flavonole durch ihre Eigenschaft ermöglicht, mit dreiwertigen Aluminiumionen über eine freie Hydroxylgruppe an Position 3 und ihre Oxo-Gruppe an Position 4 fluoreszierende Komplexe zu bilden (DENG und VAN BERKEL 1998). Zur Bildung dieser Komplexe wurde nach der chromatographischen Trennung eine Nachsäulenderivatisierung mit AlNO_3 durchgeführt.

Die HPLC-Anlage bestand aus folgenden Geräten der Fa. Waters (D-65760 Eschborn): zwei Pumpen vom Typ „515 HPLC Pump“ mit Pumpenhinterspülung, ein „In-Line Degasser AF“, ein „717_{plus} Autosampler“ und ein „Waters 2475 Multi λ Fluorescence Detector“. Ergänzt wurde das System durch einen Säulenofen der Fa. Knauer (D-14163 Berlin), in welchem die Trennsäule und das Reaktionscoil für die Nachsäulenderivatisierung auf 30°C temperiert wurden. Die isokratische Trennung der Flavonoide erfolgte in einer Kromasil-100-C-18-Säule (250 x 4 mm, Partikelgröße 5 µm) mit einer entsprechenden Kromasil-C-18-Vorsäule (5 µm) der Fa. Jasco (D-64819 Groß-Umstadt).

Als mobile Phase wurde ein Fließmittel aus Phosphatpuffer verwendet, welcher aus 0,025 mol/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Acetonitril und Methanol im Verhältnis von 135 : 56 : 9 (v:v:v) zusammengesetzt war. Der Phosphatpuffer wurde mit Orthophosphorsäure auf einen pH-Wert von 2,4 voreingestellt, so dass nach Zugabe von Methanol und Acetonitril ein End-pH-Wert des Fließmittels von ca. 2,96 resultierte.

Der Autosampler injizierte aus den HPLC-Vials jeweils 30 µl Probenflüssigkeit in die mobile Phase, die mit einer konstanten Flussrate von 1 ml/min durch die Trennsäule gepumpt wurde. Nach Passage der Trennsäule wurde dem Fließmittel in einem biokompatiblen „*Low-dead-volume*“-Mischstück (Fa. Jasco) eine methanolische Aluminiumnitratlösung (1 mol/l), die in einem Anteil von 7,2 % (v/v) einmolare Essigsäure enthielt, mit einer Flussrate von 0,4 ml/min beigemischt. Das Gemisch gelangte in einen Kapillarreaktor, der aus einer 12-m-langen vielfach gewundenen Teflonkapillare mit einem Innendurchmesser von 0,5 mm bestand (Fa. Jasco). In diesem fand die Komplexierung der Flavonole mit Al^{3+} statt. Sowohl die Trennung als auch die nachfolgende Komplexbildung fand bei einer konstanten Temperatur von 30°C im Säulenofen statt. Die Flavonol- Al^{3+} -Komplexe wurden im 2D-Fluoreszenz-Modus des Fluoreszenzdetektors mit einer Anregungswellenlänge von 422 nm und einer Emissionswellenlänge von 485 nm detektiert. Die Peaks wurden anhand des Vergleichs mit den Retentionszeiten der Reinsubstanzen identifiziert und die Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit Hilfe der Software „Empower 2“ (Fa. Waters).

3.5.1 Methodenvalidierung und -kalibrierung

Zunächst wurde die Analysemethode validiert. Hierzu wurden die Reinsubstanzen Quercetin, Kämpferol, Isorhamnetin und Tamarixetin gemeinsam in reinem Methanol aufgenommen. Von dieser Lösung wurde eine Verdünnungsreihe angesetzt, so dass methanolische Stammlösungen mit unterschiedlichen definierten Flavonolkonzentrationen entstanden. Von genücherten Hunden wurde Blutplasma vor Beginn der Versuche gewonnen, gemischt, aliquotiert und eingefroren, um einen Vorrat an nominal flavonolfreiem Plasma zu erhalten. Dieses Plasma enthielt keine nachweisbaren Konzentrationen freier Flavonole, es wird daher im Folgenden als „Leerplasma“ bezeichnet.

Zur Charakterisierung von Wiederfindung, Genauigkeit und Präzision der Analyse-methode wurden jeweils 10 µl einer Verdünnungsstufe der methanolischen Stamm-lösung zu 480 µl Leerplasma pipettiert. Dieses Plasmavolumen von 490 µl, das die Flavonole Quercetin, Kämpferol, Isorhamnetin und Tamarixetin in definierter Kon-zentration enthielt, wurde in gleicher Weise wie unter Abschnitt 3.4 beschrieben auf-gearbeitet. Abweichend davon wurden statt des Enzymgemischs 150 µl Wasser vor dem Inkubationsschritt zugefügt.

Direkt vor dem Start der HPLC-Anlage wurden methanolische Referenzproben ange-setzt, die aus 10 µl derselben Standardlösung, 10 µl internem Standard (30 µg Rhamnetin), 180 µl Methanol, 77,5 µl Wasser und 22,5 µl 32%iger HCl-Lösung be-standen. Auch von diesen Ansätzen, die als Referenzprobe 100 % der dem Leer-plasma zugesetzten Flavonole enthielten, wurden jeweils 210 µl für die Analyse in ein HPLC-Vial überführt.

Die Peaks für die jeweiligen Flavonole wurden anhand ihrer Retentionszeit aus dem Vergleich mit den methanolischen Referenzansätzen des gleichen HPLC-Laufs iden-tifiziert. Die Retentionszeiten der Einzelsubstanzen waren zuvor in separaten Läufen ermittelt worden, in denen die Einzelsubstanzen in methanolischer Lösung in die HPLC gegeben wurden. Ein Flavonol galt nur dann als sicher nachgewiesen, wenn der Signalpeak mindestens dreimal so hoch wie das mittlere Basisrauschen war (*limit of detection* = LOD). Für die Quantifizierung der Flavonole musste ein Verhältnis von Signalthöhe zu Basisrauschen von mindestens 8:1 vorliegen (*limit of quantification* = LOQ) (KARNES et al. 1991; HARTMANN et al. 1994; LIU et al. 1995; KHALED und EL-SAYED 2000; BOLARINWA und LINSEISEN 2005). Daraus ergaben sich folgen-de Grenzen der Quantifizierbarkeit (LOQ): für Quercetin 0,8 µg/l (2,4 nmol/l), für Kämpferol 0,2 µg/l (0,7 nmol/l), für Isorhamnetin 0,2 µg/l (0,7 nmol/l) und für Tama-rixetin 0,8 µg/l (2,6 nmol/l). In Abbildung 4 ist das Chromatogramm eines Plas-mastandards beispielhaft dargestellt.

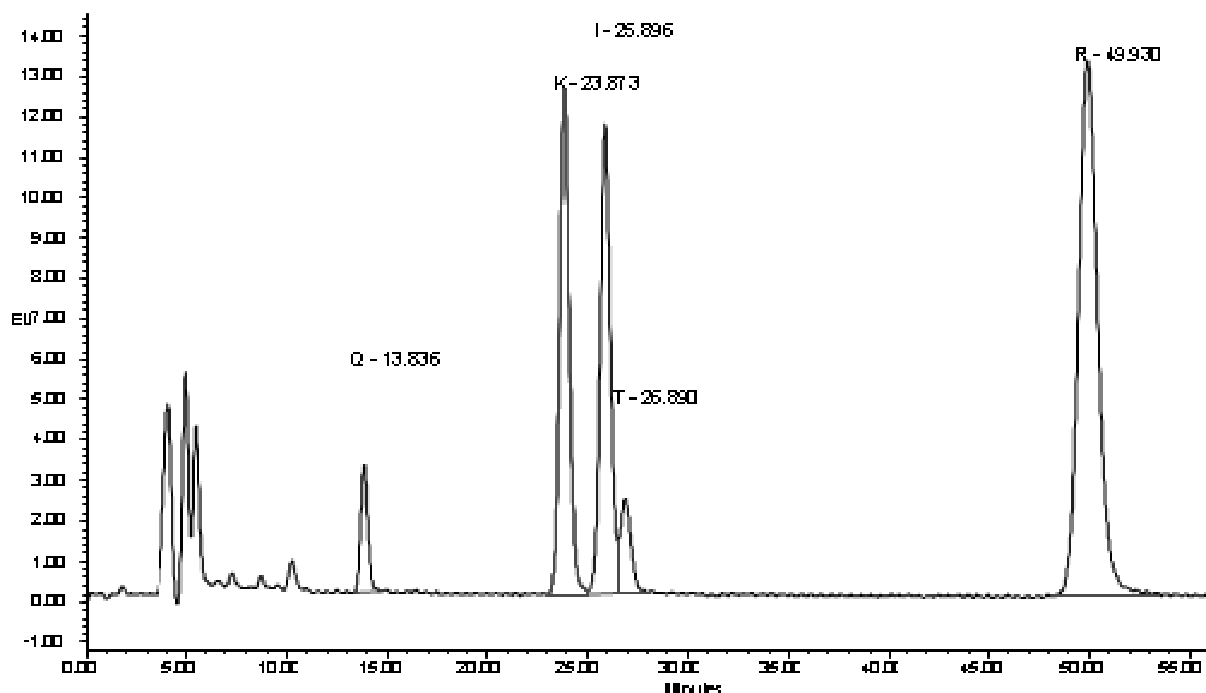


Abbildung 4: Chromatogramm eines Plasmastandards mit einer Flavonolkonzentration von je 3,27 µg/l; Q = Quercetin; K = Kämpferol; I = Isorhamnetin; T = Tamarixetin; R = Rhamnetin; jeweils mit Retentionszeit in Minuten angegeben; EU = *emission units*

Für die Methodenvalidierung wurde sowohl ein Vergleich zwischen denjenigen Plasma- und methanolischen Referenzproben durchgeführt, die innerhalb eines Tages in einem HPLC-Lauf analysiert wurden („intraday“-Vergleich), als auch zwischen solchen, die an mehreren Tagen in verschiedenen HPLC-Läufen analysiert wurden („interday“-Vergleich). Die Validierungsergebnisse sind im Anhang (Abschnitt 9.2) dargestellt.

Aus mit den jeweiligen Flavonolen versetzten Leerplasma- und methanolischen Referenzproben, die an verschiedenen Tagen analysiert worden waren, wurden für die einzelnen Flavonole Kalibriergeraden ermittelt. Im Gegensatz zu Kämpferol und Tamarixetin sind die Flavonole Quercetin und Isorhamnetin relativ instabil, d. h. ihre Konzentration kann über einen Zeitraum von einem Tag abnehmen. Dies kann bei der Analyse der eigentlichen Versuchsproben die Ergebnisse für diese beiden Flavonole beeinträchtigen, da sich aufgrund der langen Laufzeit die gesamte Analyse eines jeden Probensatzes über einen Zeitraum von bis zu 18 Stunden erstreckte. Da sich der interne Standard Rhamnetin wie Quercetin und Isorhamnetin verhält, wurde die Kalibriergerade für diese beiden

Flavonole aus ihrem Quotienten mit dem Rhamnetin-Standard gebildet. Entsprechend wurden in den Plasmaproben die Konzentrationen für Quercetin und Iso-rhamnetin aus ihrem Quotienten mit dem Rhamnetin-Standard bestimmt. Die jeweiligen Kalibriergeraden wurden durch lineare Regression ermittelt und sind in Abbildung 5 bis Abbildung 8 dargestellt.

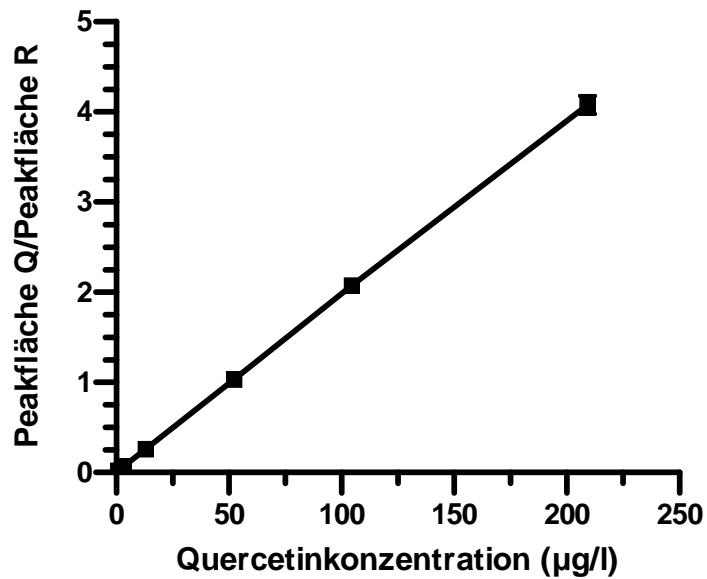


Abbildung 5: Kalibriergerade für Quercetin bezogen auf den Rhamnetin-Standard.

Q = Quercetin, R = Rhamnetin; die Gerade entspricht der Funktion

$y = (0,01956 \pm 0,00007) x$; Bestimmtheitsmaß $R^2 = 1,000$; $n = 5$

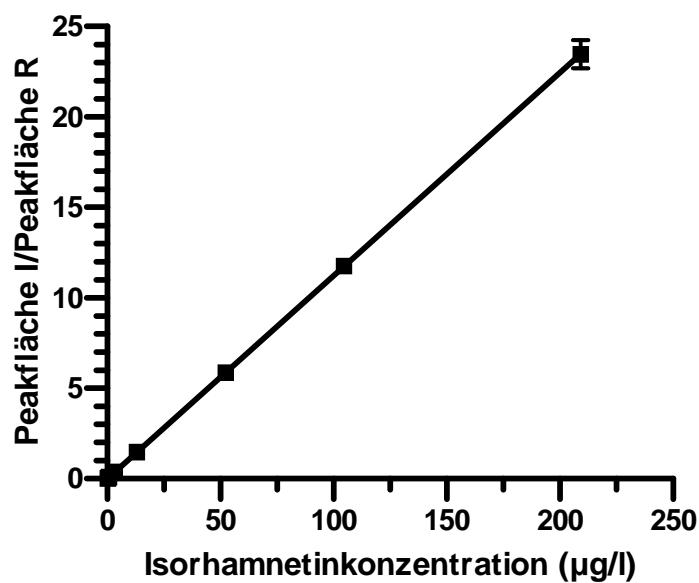


Abbildung 6: Kalibriergerade für Isorhamnetin bezogen auf den Rhamnetin-Standard.

I = Isorhamnetin, R = Rhamnetin; die Gerade entspricht der Funktion

$y = (0,1122 \pm 0,0001) x$; Bestimmtheitsmaß $R^2 = 1,000$; $n = 5$

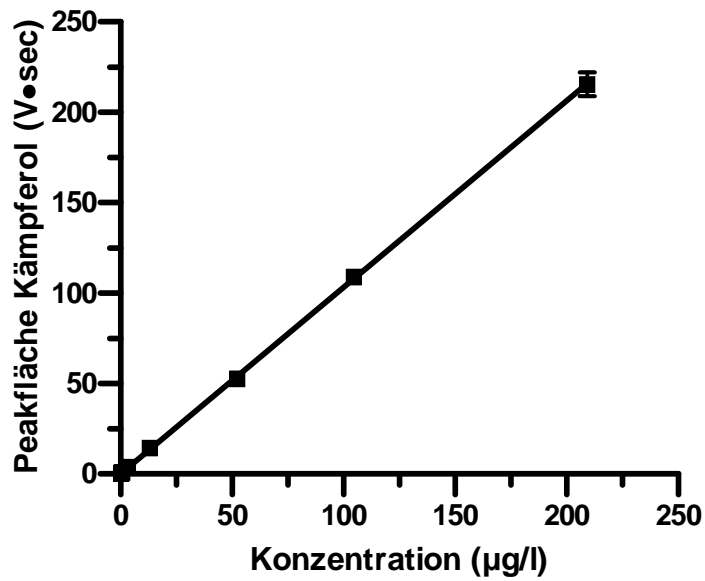


Abbildung 7: Kalibriergerade für Kämpferol.

Die Gerade entspricht der Funktion $y = (1,031 \pm 0,003) x$;

Bestimmtheitsmaß $R^2 = 1,000$; $n = 5$

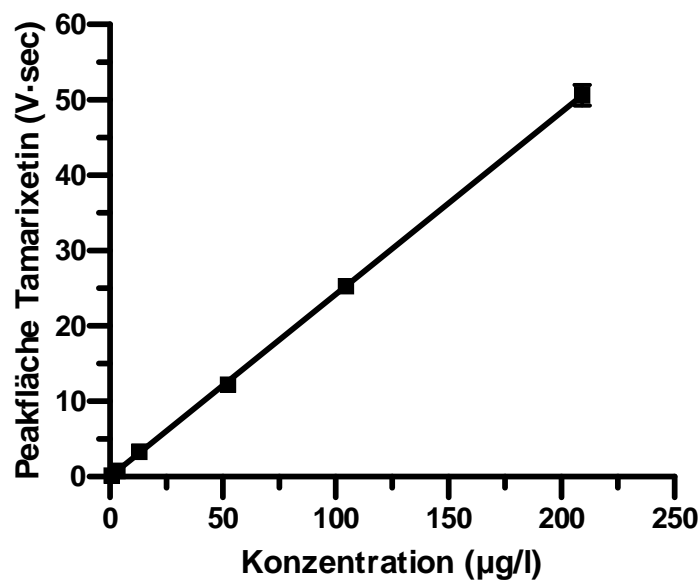


Abbildung 8: Kalibriergerade für Tamarixetin.

Die Gerade entspricht der Funktion $y = (0,2417 \pm 0,0008) x$;

Bestimmtheitsmaß $R^2 = 1,000$; $n = 5$

3.5.2 Berechnung der pharmakokinetischen Parameter

Die Umrechnung der in den Chromatogrammen ermittelten Peakflächen in Flavonol-konzentrationen erfolgte in einem Tabellenkalkulationsprogramm (Microsoft Office Excel 2003) mit Hilfe der dargestellten Kalibriergeraden. Die maximalen im Blutplasma bestimmten Plasmakonzentrationspiegel (C_{\max}) des jeweiligen Metaboliten sowie der Zeitpunkt des Auftretens dieser maximalen Plasmakonzentration (T_{\max}) wurden direkt aus den gemessenen Daten entnommen. Die terminale Eliminationsgeschwindigkeitskonstante (*terminal elimination rate constant*, λ_z) wurde mittels linearer Regression der terminalen Steigung der Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve berechnet. Die AUC (*area under the curve*) stellt die Fläche unter der Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve dar. Sie wurde nach Extrapolation der Kurve bis in die Unendlichkeit unter Anwendung der Trapezregel berechnet ($AUC_{0 \rightarrow \infty}$). Hierfür wird aus jeweils zwei Messzeitpunkten (t_n , t_{n+1}) und den dazugehörigen Konzentrationen (c_n , c_{n+1}) ein Trapez gebildet und seine Fläche nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Fläche eines Trapezes} = (t_{n+1} - t_n) \cdot (c_n + c_{n+1}) / 2$$

Die Summe aller im Plasma gemessenen Quercetinmetaboliten einschließlich Quercetin selbst wurde durch Addition der Einzel-AUCs errechnet und als AUC_{Total} angegeben:

$$AUC_{\text{Total}} = AUC_{\text{Quercetin}} + AUC_{\text{Isorhamnetin}} + AUC_{\text{Kämpferol}}$$

Für Tamarixetin konnten keine AUC-Werte berechnet werden, da es in den Plasmaproben nur selten nachgewiesen werden konnte. Bei positivem Nachweis lag dessen Konzentration fast immer unterhalb des LOQ von 0,8 µg/l.

Weiterhin wurde die mittlere Verweildauer der Metaboliten (MRT, *mean residence time*) aus dem Quotienten der Fläche unter der Zeit-gewichteten Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve (AUMC, *area under the moment curve*) und der AUC berechnet. Die pharmakokinetischen Berechnungen wurden mit Hilfe des Programms WinNonlin Version 5.1 (Pharsight Corporation, St. Louis, USA) durchgeführt.

Zur Berechnung der relativen Bioverfügbarkeit wurden die AUC_{Total} -Werte der oral applizierten Quercetinglycoside auf die AUC_{Total} -Werte nach oraler Applikation des Quercetin-Aglycons bezogen:

$$\text{Relative Bioverfügbarkeit} = (AUC_{\text{Total Quercetin-Glycosid}} / AUC_{\text{Total Quercetin}}) \cdot 100 \%$$

Die absolute Bioverfügbarkeit (F) wurde unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Dosierung aus dem Verhältnis der AUC_{Total} -Werte nach oraler und intravenöser Quercetingabe nach folgender Formel berechnet:

$$F = \frac{AUC_{oral} \cdot Dosi_{i.v.}}{AUC_{i.v.} \cdot Dosi_{oral}} \cdot 100\%$$

3.5.3 Statistische Auswertung

Alle Ergebnisse sind, sofern nicht anders vermerkt, als Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardfehlern (SEM) angegeben. Da nicht immer jede Behandlung an allen Hunden durchgeführt werden konnte bzw. es bei den Blutentnahmen zu Ausfällen einzelner Tiere kam, ist die jeweilige Anzahl (n) der miteinander verglichenen Individuen bei jeder Darstellung angegeben.

Der Effekt zweier verschiedener Behandlungen wurde mittels t-Test als gepaarter Vergleich überprüft. Die statistische Auswertung des dritten Versuchsabschnittes mit drei unterschiedlichen Behandlungen wurde mittels ANOVA mit anschließendem multiplen gepaartem Vergleich der Gruppenmittelwerte nach Bonferroni durchgeführt.

Als Signifikanzgrenze wurde $p < 0,05$ gewählt. Die statistischen Berechnungen wurden mit Hilfe des Computer-Programms GraphPad Prism Version 4 (Graphpad Software, La Jolla, USA) durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Bioverfügbarkeit von Quercetin und Rutin (je 30 mg/kg KM)

In der ersten Versuchsreihe wurden Quercetin-Aglycon und Rutin in einer Dosis von je 30 mg/kg KM in einer Testmahlzeit verabreicht, um grundsätzliche Erkenntnisse über die zu erwartenden Plasmakonzentrationen und den zeitlichen Konzentrationsverlauf zu gewinnen. Blutproben wurden über einen Zeitraum von 24 Stunden entnommen.

4.1.1 Quercetin-Aglycon

Von den Plasmaproben nach oraler Verabreichung von 30 mg Quercetin pro kg KM (90 $\mu\text{mol/kg KM}$) wurden jeweils zwei Teilproben analysiert. Ein Aliquot wurde mit dem Enzymgemisch aus β -Glucuronidase/Sulfatase vorinkubiert, um sowohl konjugierte als auch freie, d. h. unkonjugierte Flavonolmetaboliten mit der verwendeten HPLC-Methode bestimmen zu können. Das andere Aliquot wurde ohne Enzymgemisch inkubiert und somit nur die freien Flavonolaglyca, d. h. die unkonjugierten Flavonole, analysiert.

Bei den mit dem Enzymgemisch vorinkubierten Proben wurde als Hauptmetabolit Quercetin gefunden. Dessen Konzentrationsanstieg im Plasma erfolgte in der ersten Stunde sehr schnell bis zu einem ersten Maximum nach etwa 1 -1,5 h (Abbildung 9). Danach stagnierte dessen Konzentration nahezu auf einem Plateau (bei Einzeltieren fiel sie zwischenzeitlich auch wieder etwas ab) und stieg dann nach 3 bis 4 Stunden auf einen maximalen Wert (C_{max}) von $603,6 \pm 37,9 \text{ nmol/l}$ (Abbildung 9; Tabelle 3). Die anschließende Elimination war nach 24 Stunden noch nicht vollständig abgeschlossen, es waren zu diesem Zeitpunkt noch deutliche Quercetinspiegel zu messen. Als weitere Metaboliten konnten Isorhamnetin und Kämpferol bestimmt werden. Beide zeigten einen ähnlichen Konzentrations-Zeit-Verlauf wie Quercetin. Allerdings waren die C_{max} -Werte mit $38,3 \pm 3,2 \text{ nmol/l}$ für Isorhamnetin (Tabelle 3) und $4 \pm 1 \text{ nmol/l}$ für Kämpferol eine bzw. zwei Größenordnungen kleiner als bei Quercetin (Abbildung 9). Wie bereits erwähnt, konnte der Metabolit Tamarixetin wegen seines

sporadischen Nachweises, der immer unterhalb seines LOQ lag, nicht quantifiziert werden.

In den Proben ohne Enzyminkubation betrug die maximale Quercetinkonzentration $105,0 \pm 10,1$ nmol/l (Tabelle 3). Isorhamnetin hatte in diesen Proben einen C_{\max} -Wert von $15,9 \pm 1,2$ nmol/l. Die Konzentrationen an freiem (unkonjugiertem) Kämpferol lagen maximal im Bereich des LOQ-Wertes (um 0,7 nmol/l).

In dieser Versuchsreihe wurden AUC-Werte nur bis zur letzten Messung nach 24 h berechnet (AUC_{0-24h}). Bezogen auf die AUC_{Total} aller Metaboliten einschließlich der Konjugate betrug der Anteil von Quercetin 93,0 %, derjenige von Isorhamnetin 5,9 % und derjenige von Kämpferol 1,0 % (Tabelle 3). Da in der Probenreihe ohne Enzyminkubation die Konzentration von Kämpferol bei einigen Messpunkten unter dessen LOQ-Wert lag, konnte für diesen Metaboliten hier kein aussagekräftiger AUC-Wert berechnet werden. Daher wurden für die Berechnung der Gesamtverfügbarkeit (AUC_{Total}) der freien Aglyca nur die AUC-Werte von Quercetin und Isorhamnetin berücksichtigt. Bei den freien Aglyca betrug der Anteil von Quercetin 87,2 % und derjenige von Isorhamnetin 12,8 % (Tabelle 3).

Die in Abbildung 9 bis Abbildung 20 dargestellten Plasmakonzentrations-Zeit-Verläufe stellen Mittelwertkurven dar und sind daher nicht identisch mit den C_{\max} - und T_{\max} -Werten in Tabelle 3 und Tabelle 6, die direkt aus den gemessenen Konzentrationen entnommen wurden.

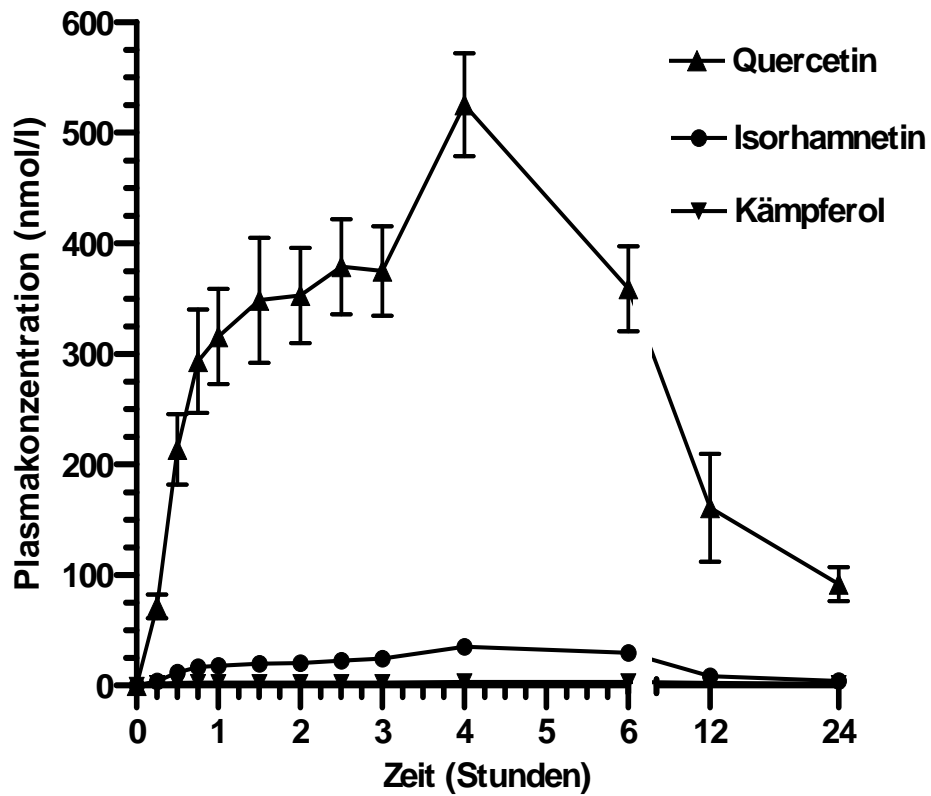


Abbildung 9: Plasmakonzentrations-Zeit-Verläufe der Metaboliten Quercetin, Isorhamnetin und Kämpferol nach oraler Gabe von 30 mg Quercetin/kg KM; die Plasmaproben waren mit Enzymgemisch vorinkubiert; angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler; n = 9

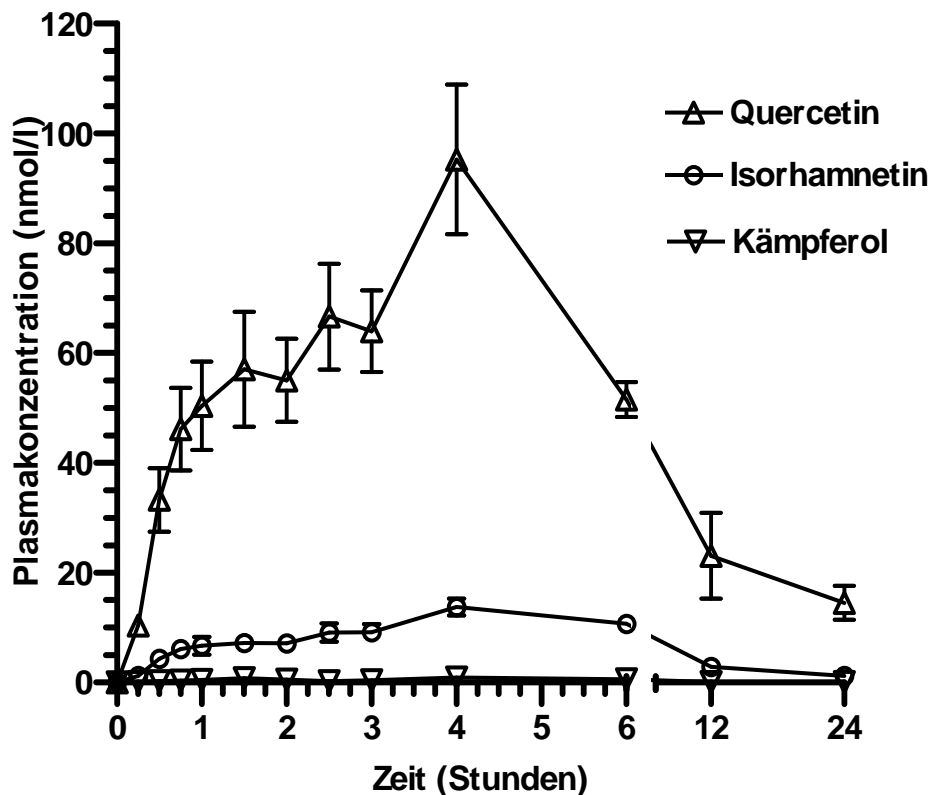


Abbildung 10: Plasmakonzentrations-Zeit-Verläufe der Metaboliten Quercetin, Isorhamnetin und Kämpferol nach oraler Gabe von 30 mg Quercetin/kg KM; die Plasmaproben wurden ohne vorherige Enzyminkubation analysiert; angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler; n = 9

Der Vergleich der Flächen unter der Kurve bis zum letzten Messpunkt von 24 Stunden nach Quercetinverabreichung (AUC_{0-24h}) ergab, dass die freien Aglyca (ohne Enzyminkubation bestimmt) ca. 16 % der gesamten Metabolitenmenge (einschließlich der Konjugate) ausmachten (Tabelle 3).

Tabelle 3: Pharmakokinetische Parameter der Metaboliten Quercetin und Isorhamnetin sowie relativer Anteil der freien Aglyca im Plasma nach oraler Gabe von 30 mg Quercetin/kg KM

	mit Enzym	ohne Enzym
C_{\max} Quercetin (nmol·l ⁻¹)	603,6 ± 37,9	105,0 ± 10,1
T_{\max} Quercetin (h)	3,6 ± 0,6	3,3 ± 0,5
C_{\max} Isorhamnetin (nmol·l ⁻¹)	38,3 ± 3,2	15,9 ± 1,2
T_{\max} Isorhamnetin (h)	3,5 ± 0,5	3,4 ± 0,5
$AUC_{\text{Quercetin}}$ (min·μmol·l ⁻¹)	315,7 ± 33,6	47,5 ± 6,1
$AUC_{\text{Isorhamnetin}}$ (min·μmol·l ⁻¹)	20,1 ± 1,6	7,0 ± 0,5
AUC_{Total} (min·μmol·l ⁻¹)	339,3 ± 34,9	54,5 ± 6,4
Fraktion (%)	100	16

Die Analyse der Plasmaproben erfolgte mit bzw. ohne Inkubation mit β -Glucuronidase/Sulfatase; C_{\max} : maximale Plasmakonzentration; T_{\max} : Zeit bis zum Erreichen der maximalen Plasmakonzentration C_{\max} ; AUC : Flächen unter den Plasmakonzentrations-Zeit-Kurven; AUC_{Total} : Summe der AUC -Werte von Quercetin und Isorhamnetin; Mittelwerte und Standardfehler; $n = 9$.

4.1.2 Rutin

Die Plasmaproben nach oraler Applikation von 30 mg Rutin/kg KM (45 μmol/kg KM) wurden mit β -Glucuronidase/Sulfatase vorinkubiert, um sowohl konjugierte als auch nicht konjugierte Quercetinmetaboliten zu erfassen. Hauptmetabolit war wiederum Quercetin. In den ersten Stunden nach oraler Aufnahme waren nur sehr geringe Quercetinkonzentrationen nachzuweisen, erst nach drei bis vier Stunden kam es zu einem deutlichen Konzentrationsanstieg (Abbildung 11). Innerhalb von sechs Stunden nach der oralen Aufnahme wurde bei zwei Hunden der C_{\max} -Wert erreicht, drei

andere Hunde erreichten diesen nach 12 Stunden. Bei vier weiteren Hunden war bis zur letzten Probenahme 24 Stunden nach der Applikation ein Konzentrationsanstieg nachzuweisen. Daher konnte bei diesen vier Hunden der C_{\max} -Wert nicht zweifelsfrei identifiziert werden. Neben Quercetin wurden Isorhamnetin und Kämpferol als weitere Metaboliten gefunden. Beide Flavonole zeigten einen ähnlichen Kurvenverlauf wie Quercetin. Deren C_{\max} -Werte lagen mit 11 ± 4 nmol/l (Isorhamnetin) und 4 ± 1 nmol/l (Kämpferol) jedoch nur bei einem Zehntel bzw. einem Hundertstel gegenüber demjenigen von Quercetin.

Bezogen auf die AUC_{Total} bis zum letzten Messzeitpunkt dieser Versuchsreihe (24 h) betrug der Anteil von Quercetin 86,4 %, derjenige von Isorhamnetin 10,7 % und derjenige von Kämpferol 2,9 %.

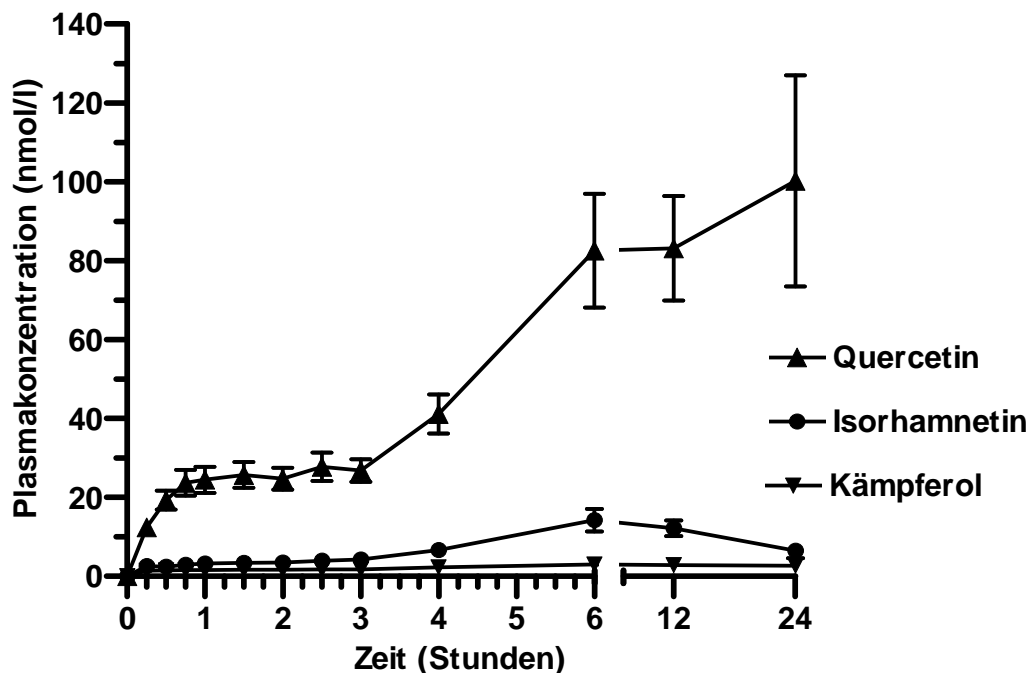


Abbildung 11: Plasmakonzentrations-Zeit-Verläufe der Metaboliten Quercetin, Isorhamnetin und Kämpferol nach oraler Gabe von 30 mg Rutin/kg KM; die Plasmaproben waren mit β -Glucuronidase/Sulfatase vorinkubiert; angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler; $n = 9$

4.2 Absolute Bioverfügbarkeit Quercetin

Von den Plasmaproben nach intravenöser Applikation von 0,5 mg Quercetin/kg KM (1,5 $\mu\text{mol/kg}$ KM) wurden ebenfalls zwei Teilproben analysiert. Ein Aliquot wurde mit β -Glucuronidase/Sulfatase-Enzymgemisch vorinkubiert, um alle Flavonolmetaboliten (freie und konjugierte) zu erfassen. Im anderen Aliquot wurden ohne Enzymzusatz nur die freien Aglyca analysiert. Da die erste Blutentnahme 15 Minuten nach der intravenösen Verabreichung durchgeführt wurde, wurde auf die theoretische Anfangskonzentration (C_0) extrapoliert (Abbildung 12). Die extrapolierten C_0 -Werte betrugen 2087 ± 1036 nmol/l für Quercetin, 3458 ± 554 nmol/l für Isorhamnetin und 16 ± 6 nmol/l für Kämpferol. Da jedoch reines Quercetin injiziert worden war, stellen die extrapolierten Isorhamnetin- und Kämpferolkonzentrationen zum Zeitpunkt C_0 nur deren scheinbare Anfangskonzentration dar. Dennoch fällt auf, dass bereits 15 Minuten nach der intravenösen Gabe die Konzentration von Isorhamnetin höher war als diejenige des applizierten Quercetins (Abbildung 12 und Abbildung 13). Dies spricht für eine sehr effiziente Methylierung des Flavonols bereits in den ersten Minuten *post injectionem*. Auch im weiteren zeitlichen Verlauf lagen die Konzentrationen von Isorhamnetin über denen von Quercetin. Somit betrug der relative Anteil der drei Flavonole, bezogen auf die $\text{AUC}_{\text{Total}}$ nach intravenöser Applikation, einschließlich ihrer Konjugate für Quercetin 39,8 %, für Isorhamnetin 58,3 % und für Kämpferol 1,9 %. Bei den freien Aglyca betrugen die relativen Anteile 17,9 % (Quercetin), 81,3 % (Isorhamnetin) und 0,8 % (Kämpferol).

Während die Gesamtkonzentrationen der Metaboliten von Quercetin, Isorhamnetin bzw. Kämpferol zum ersten Probenahmezeitpunkt 15 Minuten *post injectionem* jeweils 1084 ± 483 nmol/l, 1736 ± 411 nmol/l und 11 ± 4 nmol/l betrugen, lagen zum gleichen Zeitpunkt die Konzentrationen der freien Aglyca bei 227 ± 108 nmol/l, 1066 ± 489 nmol/l und $6,5 \pm 3,3$ nmol/l (Abbildung 12, Abbildung 13 und Abbildung 14). Dies deutet auf eine effiziente Konjugation nach intravenöser Verabreichung hin. Die terminale Eliminationshalbwertszeit ($t_{1/2}$) für die freien Aglyca betrug bei allen drei Flavonolen etwa 2 Stunden (Quercetin: $2,0 \pm 0,9$ h; Isorhamnetin: $2,6 \pm 1,0$ h; Kämpferol $2,0 \pm 0,2$ h). Dieser schnelle Abfall führte dazu, dass die Konzentration der freien Aglyca zwölf Stunden *post injectionem* unterhalb des jeweiligen LOQ lag. Unter Einschluss der konjugierten Flavonole war die jeweilige Eliminationshalbwerts-

zeit länger und lag für die Metaboliten von Quercetin bei $5,4 \pm 0,8$ h, für diejenigen von Isorhamnetin bei $3,8 \pm 0,6$ h und für die Kämpferolmetaboliten bei $20,5 \pm 10,3$ h.

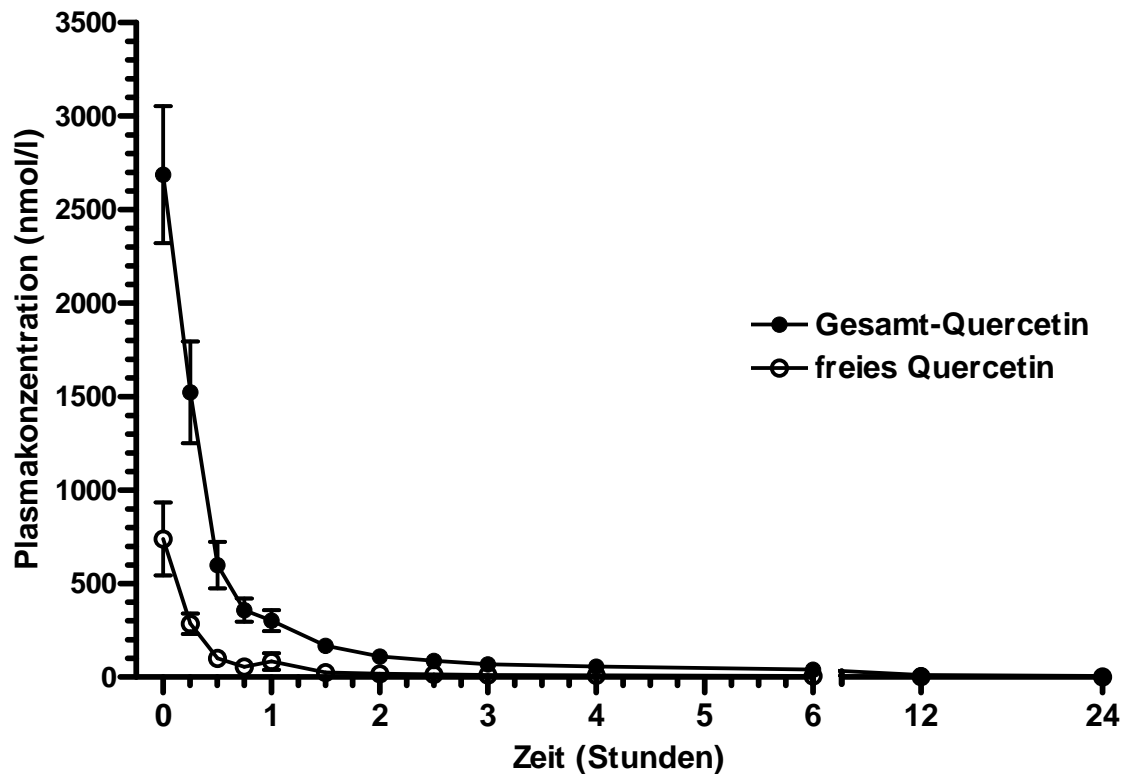


Abbildung 12: Plasmakonzentrations-Zeit-Verläufe des Metaboliten Quercetin nach intravenöser Gabe von 0,5 mg Quercetin/kg KM. Die Plasmaproben wurden ohne (freies Quercetin) bzw. mit enzymatischer Vorbehandlung (Gesamt-Quercetin) analysiert; Mittelwerte und Standardfehler; n = 8.

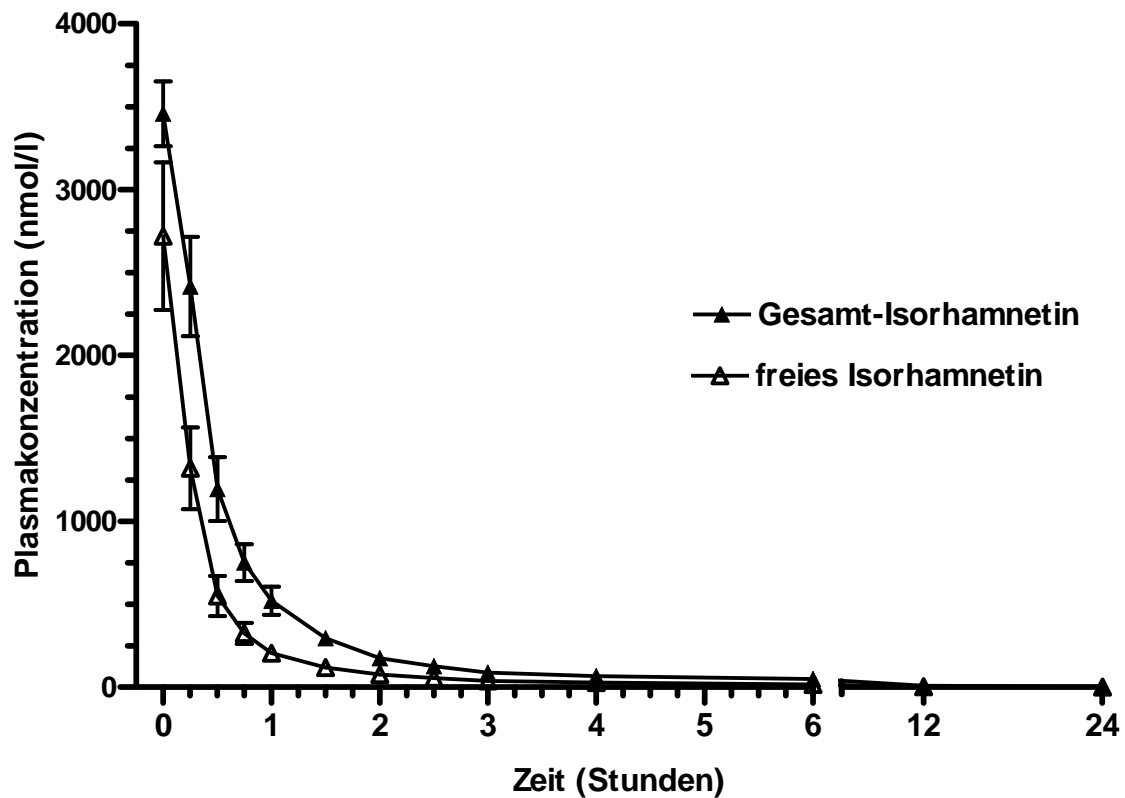


Abbildung 13: Plasmakonzentrations-Zeit-Verläufe des Metaboliten Isorhamnetin nach intravenöser Gabe von 0,5 mg Quercetin/kg KM. Die Plasmaproben wurden ohne (freies Isorhamnetin) bzw. mit enzymatischer Vorbehandlung (Gesamt-Isorhamnetin) analysiert; Mittelwerte und Standardfehler; n = 8.

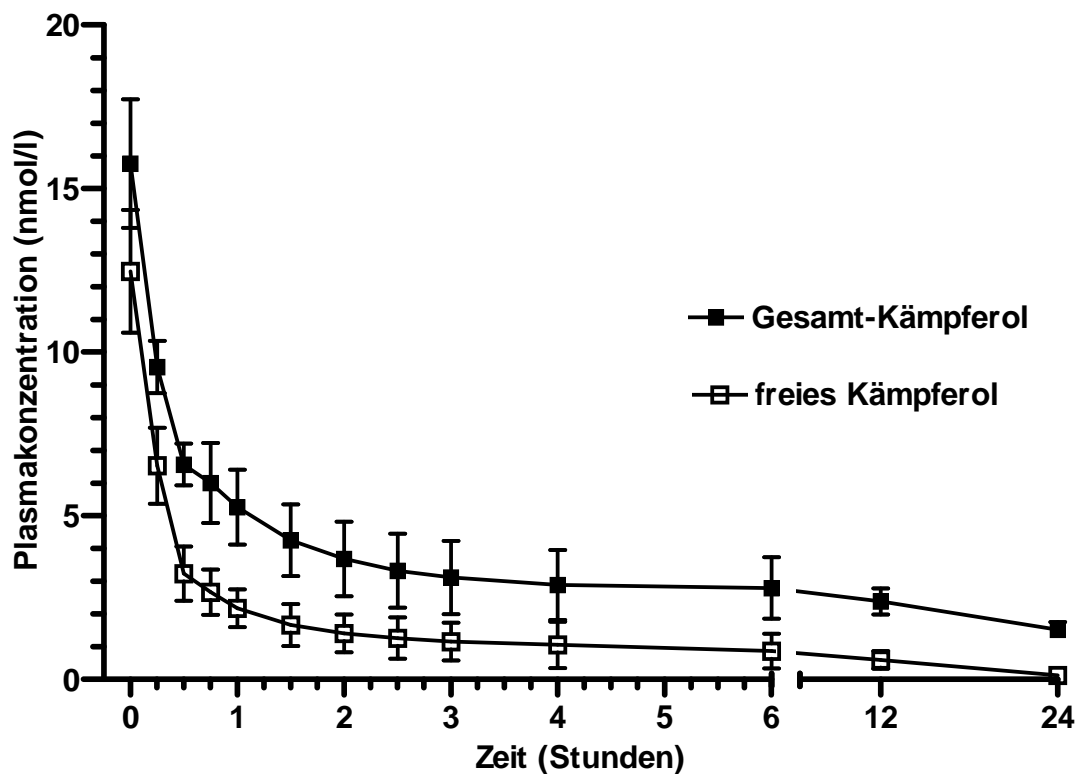


Abbildung 14: Plasmakonzentrations-Zeit-Verläufe des Metaboliten Kämpferol nach intravenöser Gabe von 0,5 mg Quercetin/kg KM. Die Plasmaproben wurden ohne (freies Kämpferol) bzw. mit enzymatischer Vorbehandlung (Gesamt-Kämpferol) analysiert; Mittelwerte und Standardfehler; $n = 8$.

Zur Berechnung der absoluten Bioverfügbarkeit (F) von Quercetin wurde die AUC_{Total} nach oraler Verabreichung auf die AUC_{Total} nach intravenöser Gabe bezogen (Tabelle 4). Bei dieser Berechnung wurden alle Metaboliten mit Flavonolstruktur, also auch die Konjugate, berücksichtigt. F betrug $3,6 \pm 0,4 \%$ ($n = 8$).

Tabelle 4: AUC-Werte nach intravenöser (i. v.) bzw. oraler Quercetinverabreichung

	Quercetin i. v. (0,5 mg/kg)	Quercetin per os (10 mg/kg)
AUC _{Quercetin} (min·µmol·l ⁻¹)	113,2 ± 12,7	185,0 ± 10,1
AUC _{Isorhamnetin} (min·µmol·l ⁻¹)	160,2 ± 17,2	9,8 ± 1,3
AUC _{Kämpferol} (min·µmol·l ⁻¹)	6,1 ± 0,6	5,8 ± 1,1
AUC _{Total} (min·µmol·l ⁻¹)	279,4 ± 27,1	200,6 ± 11,8
F (%)		3,6 ± 0,4

Die Plasmaproben wurden nach vorheriger Enzyminkubation analysiert; AUC = Fläche unter der Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve; AUC_{Total} = Summe der AUC-Werte aller drei Flavonole; F = absolute Bioverfügbarkeit; Mittelwerte und Standardfehler; n = 8.

4.3 Relative Bioverfügbarkeit verschiedener Quercetinglycoside

Für die Bestimmung der relativen Bioverfügbarkeit der beiden Quercetinglycoside Rutin und Isoquercitrin im Vergleich zu Quercetin-Aglycon wurden in dieser Versuchsreihe äquimolare Dosen der drei Flavonole (30 µmol/kg KM) zusammen mit der üblichen Testmahlzeit verabreicht. Dies entsprach einer Dosierung (pro kg KM) von 10 mg Quercetin, 14 mg Isoquercitrin bzw. 20 mg Rutin. Dieser Versuchsdurchgang wurde mit 7 Hunden durchgeführt.

In der ersten Versuchsreihe (siehe Kapitel 4.1) hatte sich herausgestellt, dass der gewählte Probenahme-Zeitraum von 24 Stunden insbesondere für Rutin zu kurz war, um die Eliminationsphase nach oraler Verabreichung mit einzuschließen. Daher wurde er in diesem Versuchsdurchgang auf 48 Stunden (nach Verabreichung von Quercetin und Isoquercitrin) bzw. auf 72 Stunden (nach Verabreichung von Rutin) verlängert. Nach diesem Zeitraum war bei fast allen Tieren die Konzentration der gemessenen Metaboliten unter deren LOQ gefallen.

4.3.1 Quercetin-Aglycon

Von den Plasmaproben nach oraler Verabreichung von 10 mg Quercetin/kg KM wurden wiederum jeweils zwei Teilproben analysiert. Zur Erfassung aller Metaboliten wurde ein Aliquot mit β -Glucuronidase/Sulfatase vorinkubiert, zur Bestimmung der nichtkonjugierten, freien Flavonolaglyca wurde eine weitere Teilprobe ohne Enzymzusatz aufgearbeitet.

Wie im ersten Versuchsdurchgang wurde auch hier Quercetin als quantitativ wichtigster Metabolit (Konjugate eingeschlossen) bestimmt. Quercetin wurde nach Aufnahme schnell absorbiert und erreichte nach etwa einer Stunde einen ersten Plasmapeak von etwa 230 nmol/l (Abbildung 15; Tabelle 6). Danach sank die Quercetinkonzentration nur geringfügig ab und blieb auf einem relativ hohen Niveau bis nach etwa 4 Stunden ein zweites Maximum erreicht wurde. Im Anschluss daran folgte die Eliminationsphase, die nach 48 Stunden nahezu vollständig abgeschlossen war. Lediglich bei zwei der sieben Hunde konnte nach 48 Stunden noch eine Quercetinkonzentration oberhalb des LOQ nachgewiesen werden. Die beiden weiteren Metaboliten Isorhamnetin und Kämpferol zeigten einen ähnlichen Kurvenverlauf wie Quercetin. Nach einer zunächst schnellen Absorption wurden die maximalen Plasmaspiegel nach $5,1 \pm 3,0$ h (Isorhamnetin) bzw. $6,3 \pm 3,4$ h (Kämpferol) erreicht. Die C_{\max} -Werte waren jedoch mit $17,8 \pm 4,5$ nmol/l (Isorhamnetin) bzw. $3,0 \pm 2,0$ nmol/l (Kämpferol) ähnlich wie schon in der ersten Versuchsreihe beobachtet eine bzw. zwei Größenordnungen niedriger als beim Metaboliten Quercetin (Abbildung 16, Abbildung 17).

Die Konzentration der freien Aglyca im Blutplasma lag deutlich niedriger. Hier erreichte Quercetin eine maximale Konzentration von $44,3 \pm 11,1$ nmol/l (Abbildung 15). Freies Isorhamnetin hatte eine maximale Konzentration von $6,5 \pm 1,7$ nmol/l (Abbildung 16). Freies Kämpferol erreichte in den meisten Plasmaproben nicht das LOQ, daher konnte hierfür kein C_{\max} -Wert bestimmt werden.

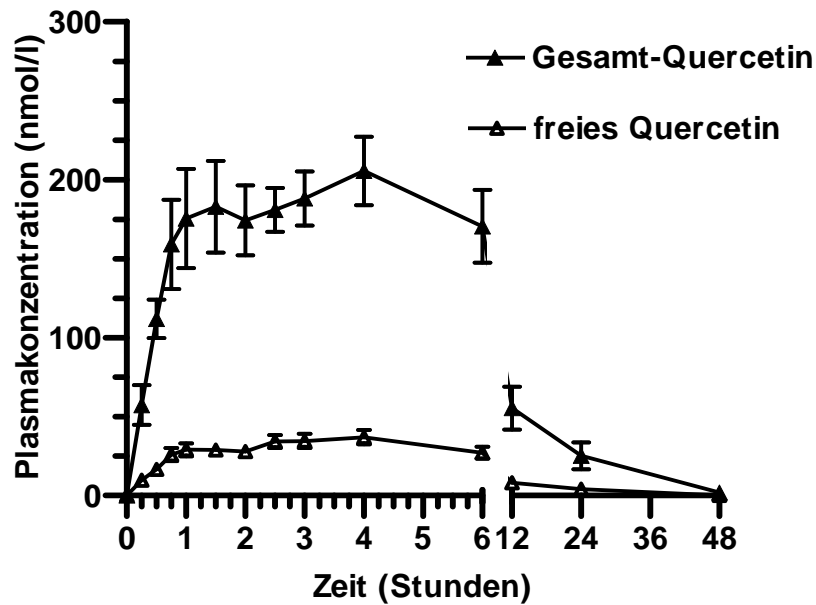


Abbildung 15: Plasmakonzentrations-Zeit-Verläufe des Metaboliten Quercetin nach oraler Gabe von 10 mg Quercetin/kg KM. Die Plasmaproben wurden ohne (freies Quercetin) bzw. mit enzymatischer Vorbehandlung (Gesamt-Quercetin) analysiert; Mittelwerte und Standardfehler; n = 7

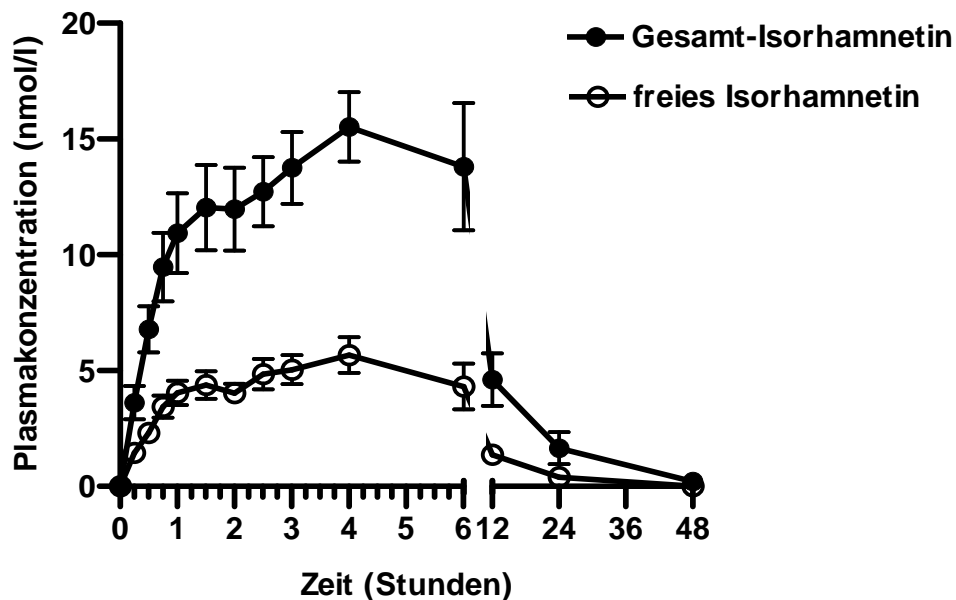


Abbildung 16: Plasmakonzentrations-Zeit-Verläufe des Metaboliten Isorhamnetin nach oraler Gabe von 10 mg Quercetin/kg KM. Die Plasmaproben wurden ohne (freies Isorhamnetin) bzw. mit enzymatischer Vorbehandlung (Gesamt-Isorhamnetin) analysiert; Mittelwerte und Standardfehler; n = 7

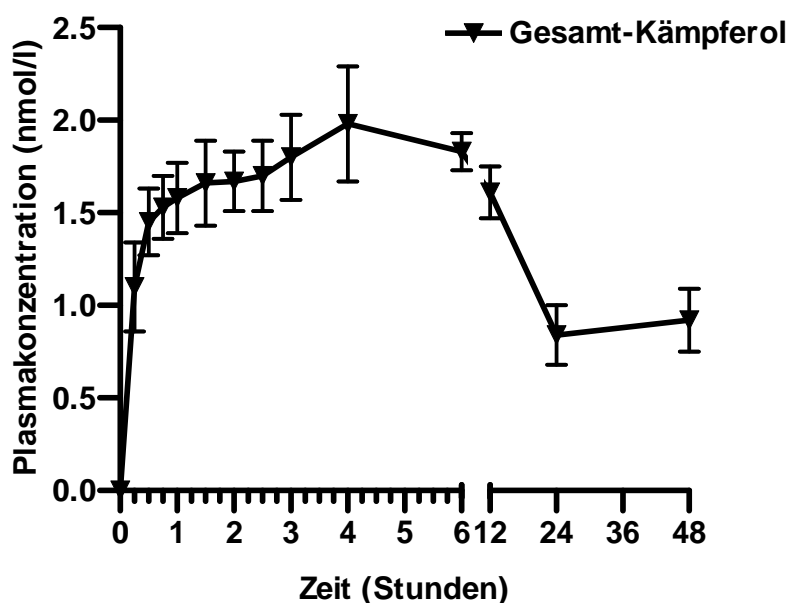


Abbildung 17: Plasmakonzentrations-Zeit-Verlauf des Metaboliten Kämpferol nach oraler Gabe von 10 mg Quercetin/kg KM; die Plasmaproben waren enzymatisch vorbehandelt. Auf die Darstellung des Konzentrationsverlaufs der freien Kämpferolaglyca wurde verzichtet, da deren Konzentration bei den meisten Zeitpunkten unterhalb des LOQ lag; Mittelwerte und Standardfehler; n = 7

Bezogen auf die AUC_{Total} aller Metaboliten (einschließlich der Konjugate) betrug der relative Anteil von Quercetin 91,6 %, derjenige von Isorhamnetin 6,0 % und der von Kämpferol 2,4 %. Bei den freien Flavonolaglyca betrug der Anteil von Quercetin 86,8 % und der von Isorhamnetin 13,2 %. Wie bereits erwähnt, konnten die freien Kämpferolaglyca aufgrund zu geringer Konzentration quantitativ nicht ausgewertet werden. Der Anteil nicht konjugierter Flavonolmetaboliten bezogen auf alle Flavonolmetaboliten betrug etwa 18 % (Tabelle 5).

Tabelle 5: AUC-Werte der unkonjugierten und der Gesamtmetaboliten nach oraler Gabe von 10 mg Quercetin/kg KM.

	unkonjugierte Metaboliten	Gesamtmetaboliten
AUC _{Quercetin} (min·µmol·l ⁻¹)	25,9 ± 2,7	151,8 ± 9,1
AUC _{Isorhamnetin} (min·µmol·l ⁻¹)	3,8 ± 0,4	11,7 ± 12,9
AUC _{Kämpferol} (min·µmol·l ⁻¹)	^a	3,6 ± 4,7
AUC _{total} (min·µmol·l ⁻¹)	30,4 ± 1,4	167,1 ± 9,3
Fraktion (%)	18,2	100

Die unkonjugierten Metaboliten wurden ohne Enzymvorbehandlung, die Gesamtmetaboliten nach Enzymvorbehandlung bestimmt. AUC = Fläche unter der Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve; Mittelwerte und Standardfehler; n = 7, ^a nicht bestimmbar, da kleiner LOQ

4.3.2 Rutin

Die Plasmaproben nach oraler Applikation von 20 mg Rutin/kg KM wurden alle mit β-Glucuronidase-/Sulfatase-Gemisch vorinkubiert, um die Gesamtheit aller freien und konjugierten Flavonolmetaboliten zu erfassen. Auf die separate Bestimmung des Anteils freier Aglyca wurde verzichtet.

Die Konzentration des Hauptmetaboliten Quercetin stieg im Plasma in den ersten drei bis vier Stunden nach der Verabreichung nur gering an und erreichte Werte um maximal 20 nmol/l. Erst danach kam es zu einem deutlichen Konzentrationsanstieg (Abbildung 18). Der T_{max}-Wert von etwa 11 h verdeutlicht die stark verzögerte Absorption von Quercetin aus Rutin. Dieser war auch vom späteren, zweiten Plasma-peak nach Aufnahme des Quercetin-Aglycons (T_{max2}) signifikant verschieden (Tabelle 6). Hierbei war die Streuung der individuellen T_{max}-Werte jedoch deutlich größer als nach oraler Aufnahme des Quercetin-Aglycons. Die einzelnen T_{max}-Werte reichten von 3 bis 24 h. Neben der Absorptions- dauerte auch die Eliminationsphase aus dem Plasma nach Rutinapplikation wesentlich länger als bei den anderen beiden Applikationen. Dies zeigte sich in einer fast dreimal längeren mittleren Verweildauer

(MRT) des Quercetins aus Rutin (Tabelle 6). Dies hatte zur Konsequenz, dass trotz der niedrigeren C_{\max} -Werte nach Rutin- die relative Bioverfügbarkeit, bestimmt als AUC_{Total} , nicht geringer war als nach oraler Quercetin-Aglycon-Verabreichung.

Die beiden Metaboliten Isorhamnetin und Kämpferol zeigten einen ähnlichen Konzentrationsverlauf wie Quercetin. Ihre C_{\max} -Werte lagen mit $16,1 \pm 6,6$ nmol/l (Isorhamnetin) und $3,6 \pm 1,2$ nmol/l (Kämpferol) jedoch wiederum nur bei etwa einem Zehntel bzw. einem Hundertstel gegenüber dem C_{\max} -Wert von Quercetin ($113,7 \pm 18,1$ nmol/l). Bezogen auf die AUC_{Total} betrug der Anteil von Quercetin 84,5 %, derjenige von Isorhamnetin 10,6 % und derjenige von Kämpferol 4,9 %.

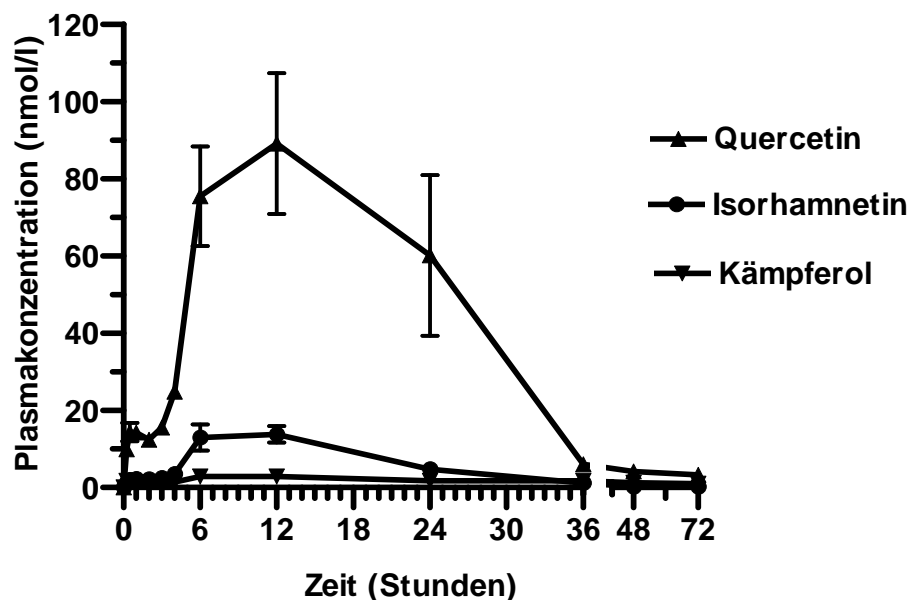


Abbildung 18: Plasmakonzentrations-Zeit-Verläufe der Metaboliten Quercetin, Isorhamnetin und Kämpferol nach oraler Gabe von 20 mg Rutin/kg KM; die Plasma-proben waren enzymatisch vorbehandelt; Mittelwerte und Standardfehler; n = 9

4.3.3 Isoquercitrin

Auch bei den Plasmaproben nach oraler Applikation von 14 mg Isoquercitrin/kg KM wurde nur die Gesamtheit aller freien und konjugierten Flavonolmetaboliten bestimmt. Der zeitliche Verlauf der Plasmakonzentration des Hauptmetaboliten Quercetin wies zwei deutliche Maxima auf (Abbildung 19). Nach einer schnellen Absorptionsphase wurde der erste Plasmapeak bereits nach 0,8 Stunden erreicht, signifikant

eher als nach oraler Aufnahme des Quercetin-Aglycons, bei dem der entsprechende $T_{\max 1}$ -Wert 1,2 h betrug (Tabelle 6). Der $C_{\max 1}$ -Wert des Metaboliten Quercetin nach Verabreichung des Quercetin-Glucosids war mit $667,4 \pm 131,2$ nmol/l fast dreimal so hoch wie nach Verabreichung des Aglycons. Nach einem geringen Abfall der Plasmakonzentration in den folgenden Stunden wurde das zweite Maximum etwa 4 Stunden nach Isoquercitrin-Ingestion erreicht, zum gleichen Zeitpunkt wie auch nach Verabreichung des Aglycons (Tabelle 6). Der $C_{\max 2}$ -Wert des Metaboliten Quercetin aus Isoquercitrin übertraf mit $888,3 \pm 71,0$ nmol/l sogar das erste Maximum und war fast viermal so hoch wie der $C_{\max 2}$ -Wert nach Verabreichung des Aglycons. Allerdings war bei Betrachtung der individuellen Plasmakonzentrations-Verläufe nicht bei allen Tieren $C_{\max 2}$ höher als $C_{\max 1}$. Die beiden weiteren Metaboliten Isorhamnetin und Kämpferol zeigten nach Aufnahme von Isoquercitrin einen ähnlichen zweigipfeligen Konzentrationsverlauf wie Quercetin mit ähnlichen $T_{\max 1}$ - und $T_{\max 2}$ -Werten (Abbildung 19). Die Konzentrationen waren wiederum um eine (Isorhamnetin) bzw. zwei (Kämpferol) Größenordnungen niedriger als diejenigen des Hauptmetaboliten Quercetin (Abbildung 19). Die Verteilung der einzelnen Metaboliten nach Isoquercitrin-Verabreichung entsprach im Wesentlichen derjenigen nach den anderen Behandlungen. Der Anteil von Quercetin betrug 86,6 %, der von Isorhamnetin 10,8 % und derjenige von Kämpferol 2,5 %. Die relative Bioverfügbarkeit des Metaboliten Quercetin aus Isoquercitrin war jedoch mehr als doppelt so hoch wie aus dem Quercetin-Aglycon (Tabelle 6). Zum Vergleich sind die Plasmakonzentrations-Zeit-Verläufe des Metaboliten Quercetin nach den drei verschiedenen Behandlungen in Abbildung 20 dargestellt.

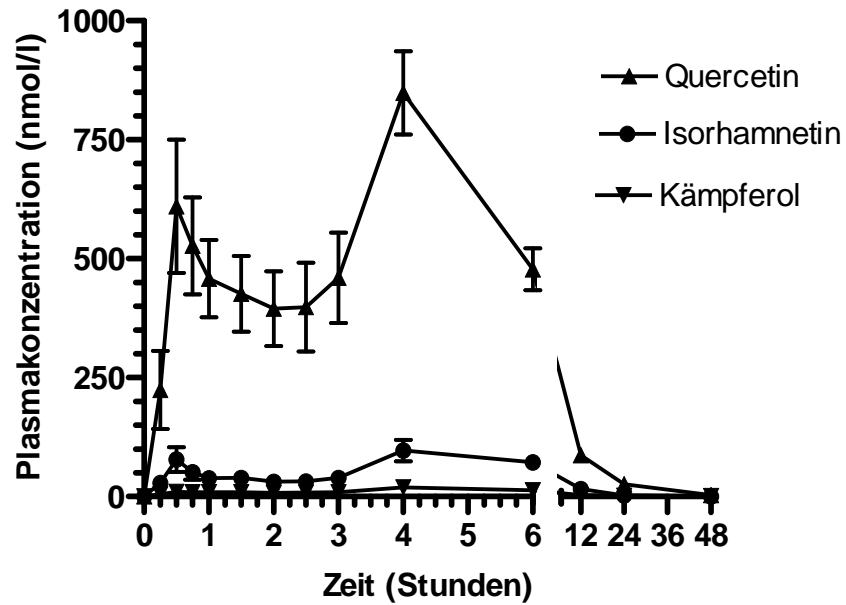


Abbildung 19: Plasmakonzentrations-Zeit-Verläufe der Metaboliten Quercetin, Isorhamnetin und Kämpferol nach oraler Gabe von 14 mg Isoquercitrin/kg KM; die Plasmaproben waren enzymatisch vorbehandelt; Mittelwerte und Standardfehler; n = 7.

Tabelle 6: Pharmakokinetische Parameter des Plasmametaboliten Quercetin und AUC-Werte der Metaboliten Quercetin, Isorhamnetin und Kämpferol nach oraler Verabreichung von Quercetin-Aglycon, Isoquercitrin oder Rutin (je 30 µmol/kg KM)

Pharmakokinetische Parameter	Quercetin	Isoquercitrin	Rutin
$C_{\max 1}$ (nmol·L ⁻¹)	233,5 ± 31,3	667,4 ± 131,2**	17,0 ± 2,2
$T_{\max 1}$ (h)	1,2 ± 0,1*	0,8 ± 0,1	0,7 ± 0,1
$C_{\max 2}$ (nmol·L ⁻¹)	229,2 ± 18,2	888,3 ± 71,0***	113,7 ± 18,1
$T_{\max 2}$ (h)	3,9 ± 0,5	4,1 ± 0,3	11,1 ± 2,4*
MRT (h)	7,8 ± 0,6	6,4 ± 0,5	18,0 ± 1,0***
$AUC_{\text{Quercetin}}$ (min·µmol·l ⁻¹)	155,2 ± 17,4	353,4 ± 21,3***	131,2 ± 20,0
$AUC_{\text{Isorhamnetin}}$ (min·µmol·l ⁻¹)	11,4 ± 1,9	44,9 ± 7,9**	17,0 ± 1,9
$AUC_{\text{Kämpferol}}$ (min·µmol·l ⁻¹)	8,2 ± 1,5	11,9 ± 1,0	11,8 ± 0,9
AUC_{Total} (min·µmol·l ⁻¹)	174,9 ± 19,7	410,2 ± 26,7***	160,0 ± 21,3
relative Bioverfügbarkeit (%)	100	234,5	91,5

C_{\max} : maximale Plasmakonzentration, die Indices 1 bzw. 2 kennzeichnen den ersten bzw. zweiten Plasmapeak; T_{\max} : Zeit bis zum Erreichen der maximalen Plasmakonzentrationen C_{\max} ; MRT: mittlere Verweildauer im Plasma; AUC: Flächen unter den Plasmakonzentrations-Zeit-Kurven; AUC_{Total} : Summe der AUC-Werte aller drei Flavonolmetaboliten. Die Plasmaproben wurden vor der Analyse enzymatisch vorbehandelt. Angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler; *, **, *** zeigen signifikant unterschiedliche Werte zu Werten anderer Spalten an mit $p < 0,05$, $p < 0,01$ bzw. $p < 0,001$; $n = 7$.

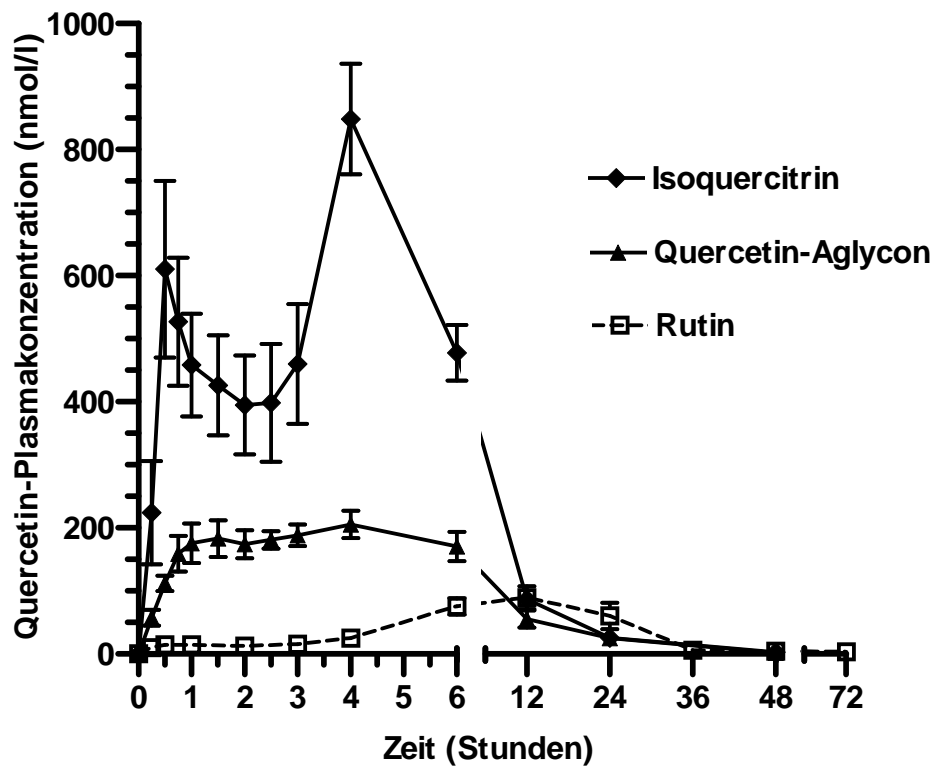


Abbildung 20: Plasmakonzentrations-Zeit-Verläufe des Metaboliten Quercetin nach Verabreichung von je 30 $\mu\text{mol/kg}$ KM Isoquercitrin, Quercetin-Aglycon und Rutin; alle Plasmaproben waren enzymatisch vorbehandelt; die Daten wurden bereits einzeln in den Abbildungen 15, 18 und 19 dargestellt; Mittelwerte und Standardfehler; $n = 7$.

5 Diskussion

5.1 Zielsetzung der Studie

Mit dieser Studie sollte die Bioverfügbarkeit des Flavonols Quercetin sowie pharmakokinetische Parameter seiner Metaboliten erstmalig bei der Spezies Hund ermittelt werden. Dabei wurde die mit einer Testmahlzeit verabreichte Dosis in einem Bereich gewählt, der auch bei kommerziellen mit Quercetin supplementierten Hundefuttermitteln in der Praxis erreicht werden kann. Die im Blut nach oraler Quercetinaufnahme analysierten Metaboliten waren ausschließlich solche mit intakter Flavonolstruktur. Weitere, insbesondere im Dickdarm durch bakteriellen Abbau entstehende Metaboliten wie einfache Phenolsäuren (siehe Abschnitt 2.4.5) blieben unberücksichtigt. Der Grund hierfür war, dass die Quercetin wie auch anderen Flavonolen zugesprochenen spezifischen Wirkungen (siehe Abschnitt 2.3) auf der charakteristischen Molekülstruktur der Flavonoide beruhen. Neben der absoluten wurde auch die relative Bioverfügbarkeit aus verschiedenen Quercetinglycosiden untersucht, da bei anderen Spezies beobachtet wurde, dass die Zuckerreste einen entscheidenden Einfluss auf die Bioverfügbarkeit des Flavonols haben. Die mit dieser Untersuchung erhaltenen Konzentrationsverläufe können dabei helfen, die Wahrscheinlichkeit möglicher Quercetinwirkungen *in vivo* bei der Spezies Hund besser abzuschätzen.

5.2 Methodische Aspekte

5.2.1 Auswahl der Versuchstiere und Versuchsanordnung

Bei den verwendeten Hunden handelte es sich um eine recht homogene Gruppe adulter und gleichaltriger Beagles beiderlei Geschlechts (die männlichen Tiere waren kastriert). Haltungsbedingungen und Vorbehandlung (insbesondere die Fütterung) waren bei den Tieren gleich. Es ist bekannt, dass Rasseunterschiede hinsichtlich des Fremdstoffwechsels bestehen können.

Daher könnten die in dieser Studie bestimmten pharmakokinetischen Daten bei anderen Rassen etwas abweichend sein. Dies sollte aber die Aussagekraft dieser Untersuchung für die Spezies Hund grundsätzlich nicht in Frage stellen, da pharmako-

kinetische Daten ohnehin einer gewissen Variabilität unterliegen und von vielen Faktoren beeinflusst werden.

Da Quercetin selbst Enzyme des Fremdstoffwechsels induzieren kann (siehe Abschnitt 2.3.2), ist ein veränderter Metabolismus und somit eine andere Pharmakokinetik des Flavonols nach vorangegangenen Quercetinaufnahmen nicht auszuschließen. Um eine mögliche Wirkung solcher Induktionseffekte zu berücksichtigen, wurden sämtliche Versuchsreihen als Lateinisches Quadrat angelegt. Darüber hinaus wurde ein zeitlicher Abstand von mindestens zwei Monaten zwischen den drei Versuchsabschnitten eingehalten, um ein Abklingen solcher Wirkungen zu ermöglichen.

Grundsätzlich ist davon auszugehen, dass die gewählte Methode, nur die Blutspiegel in die Untersuchung einzubeziehen (Ein-Kompartiment-System), sehr aussagekräftig ist. Dies zeigen die in Kapitel 2.4.7 genannten Arbeiten von DE BOER et al. (2005) und BIEGER et al. (2008), die die Gewebeverteilung von Quercetinmetaboliten an Ratten und Schweinen untersuchten. Danach kommt es zu keiner Akkumulation in Geweben außerhalb des Intestinaltraktes, weder nach kurz- noch nach längerfristiger Quercetinaufnahme. Die höchsten Gesamtflavonolkonzentrationen fanden sich bei BIEGER et al. (2008) nach Abschluss der Versuche in den an der Exkretion beteiligten Organen Dick- und Dünndarm sowie in Niere und Leber. Von manchen Autoren wird zur Bestimmung der Bioverfügbarkeit von Flavonoiden die Messung der kumulativen Flavonoidexkretion in Urin bevorzugt (CROZIER 2009). Eine solche Messung kann aber nur einen Anhaltspunkt über die minimal absorbierte Flavonoidmenge vermitteln, denn es wurde bereits gezeigt, dass über 40 % der absorbierten Quercetinmenge dem *First-pass*-Metabolismus unterliegt und via Gallenflüssigkeit eliminiert wird (CRESPY et al. 2003).

5.2.2 Wahl der Testmahlzeit

Für die Verabreichung der Flavonole wurden diese in einer definierten Konzentration zu einer nominell flavonolfreien Testmahlzeit gegeben. Die Aufnahme einer Testmahlzeit ohne Flavonole wie auch die reguläre tägliche Diät der Hunde führte zu keiner Erhöhung der Flavonolkonzentration im Plasma. Substanzen mit zu den Flavonolen identischen Retentionszeiten wurden maximal in Konzentrationen unterhalb der LOQ detektiert.

Basierend auf publizierten Studien zur Verfügbarkeit von Quercetin bei Schweinen und Ratten wurde die Testmahlzeit hinsichtlich Menge und Fettgehalt so ausgewählt, dass für das Flavonol eine vergleichsweise hohe Verfügbarkeit zu erwarten war (AZUMA et al. 2002, 2003; CERMAK et al. 2003; LESSER et al. 2004). Daher kann davon ausgegangen werden, dass bei Fütterung eines Futters mit vergleichbaren Quercetiningehalten die in dieser Untersuchung bestimmte Verfügbarkeit und die Flavonolkonzentrationen im Plasma kaum wesentlich überschritten werden.

5.2.3 Einfluss der Zeitpunkte für die Probennahme auf die Berechnung der Verfügbarkeit

Der Zeitrahmen für die Blutprobennahme von 24 Stunden in der ersten Versuchsreihe, der sich an publizierten Untersuchungen anderer Spezies orientierte, erwies sich als zu kurz, da nach diesem Zeitraum noch recht hohe Flavonolkonzentrationen gemessen werden konnten. Dies galt insbesondere nach der Verabreichung von Rutin, bei der bei einzelnen Tieren sogar nach 24 Stunden noch keine Eliminationsphase der Metaboliten erkennbar war. Daher war in dieser Versuchsreihe eine sinnvolle pharmakokinetische Auswertung nicht möglich und das Zeitfenster für die Probenahme wurde beim Vergleich der Verfügbarkeit der verschiedenen Glycoside auf 48 bzw. 72 Stunden (für Rutin) verlängert. Der mit Hilfe der terminalen Eliminationskonstante berechnete über 48 Stunden hinausgehende (extrapolierte) Anteil der $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ betrug für den Hauptmetaboliten Quercetin nach Quercetinverabreichung bei 7 von 9 Hunden weniger als 5 %. Aufgrund einer längeren Eliminationsphase bei den übrigen 2 Hunden lag der extrapolierte Anteil im Mittel aller Tiere bei 8,5 %. Nach Verfütterung von Isoquercitrin lag der extrapolierte, über 48 h hinausgehende Anteil an der $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ des Hauptmetaboliten im Mittel sogar bei nur 2,1 %. Der entsprechende Wert für Rutin (hier wurde der letzte Wert nach 72 Stunden gemessen) betrug ebenfalls nur 5,2 %. Damit liegt der durch gemessene Plasmakonzentrationen bestimmte, nicht extrapolierte Anteil der AUC jeweils über 90 % was die Aussagekraft der errechneten pharmakokinetischen Parameter unterstreicht.

Dies gilt jedoch nicht für die nach intravenöser Quercetinapplikation bestimmten AUC-Werte. Hier betrug der auf den Zeitpunkt der Injektion ($t = 0$ min) extrapolierte Anteil für die beiden Hauptmetaboliten Quercetin und Isorhamnetin jeweils ca. 35 %

(vergleiche Abbildung 12 und Abbildung 13). Es wäre daher besser gewesen, nicht erst nach 15 Minuten die erste Blutprobe zu entnehmen, sondern bereits zu früheren Zeitpunkten (beispielsweise auch nach 3,75 und 7,5 Minuten). Dies hätte aber die gesamte Anzahl der Blutproben erhöht und wurde von der genehmigenden Behörde für den Tierversuch nicht bewilligt. Daher verbleibt ein relativ großer Fehler für die ermittelten AUC-Werte nach intravenöser Applikation, der sich natürlich auch auf die Berechnung der absoluten Bioverfügbarkeit auswirkt. Allerdings ist für die Abschätzung der absoluten Bioverfügbarkeit die Genauigkeit des Wertes F weniger entscheidend als dessen Größenordnung.

5.2.4 Analysemethode

Für den Nachweis der Flavonolmetaboliten im Blutplasma wurde eine bereits bei ähnlichen Studien etablierte HPLC-Methode mit Fluoreszenzdetektion verwendet. Sie zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität aus, die bis in niedrig-nanomolare Konzentrationen für einzelne Flavonole reicht und mit der die Stellungsisomere Isorhamnetin und Tamarixetin differenziert werden können (HOLLMAN et al. 1996; ADER et al. 2000; CERMAK et al. 2003). Bei Festlegung eines minimalen Verhältnisses zwischen Signal und Basisrauschen von 8:1 als Grenze der Quantifizierbarkeit (KARNES et al. 1991; HARTMANN et al. 1994; BRESSOLLE et al. 1996) betrug das LOQ für Quercetin und Tamarixetin 2,4 nmol/l, für Isorhamnetin und Kämpferol sogar nur 0,7 nmol/l. Damit war es möglich, bei der gewählten praxisrelevanten Quercetindosis dessen Metaboliten im Blutplasma bis zu einem Zeitraum von 48 Stunden nach Verabreichung zu quantifizieren und somit deren Pharmakokinetik zu bestimmen.

Die Validierung der Methode ergab eine Wiederfindung der einzelnen Flavonole im Bereich von 80 bis 100 % und eine akzeptable Präzision sowohl innerhalb eines Analysenlaufs ("intraday") als auch zwischen verschiedenen Analyseläufen ("inter-day"). Detaillierte Ergebnisse der Validierung können dem Anhang dieser Arbeit entnommen werden. Damit kommt sie zu vergleichbaren Ergebnissen wie andere Untersuchungen (ADER et al. 2000).

Ein gewisser Nachteil dieser Methode besteht darin, dass die erreichte Sensitivität mittels Fluoreszenzdetektion nur dadurch erreicht werden kann, dass die Flavonole mit Al^{3+} nach ihrer chromatographischen Trennung einen fluoreszierenden Komplex

bilden müssen. Dafür ist eine freie Hydroxylgruppe an Position 3 sowie die Oxogruppe an Position 4 nötig (DENG und VAN BERKEL 1998). Wie bereits aus Untersuchungen bei anderen Spezies bekannt ist, zirkulieren im Blutplasma jedoch hauptsächlich durch Phase II-Reaktionen des Fremdstoffwechsels entstandene konjugierte Metaboliten, deren funktionelle Gruppen eine solche Komplexierung verhindern. Um diese Metaboliten nachweisen zu können, mussten die Proben mit einem Enzymgemisch mit β -Glucuronidase- und Sulfataseaktivität während der Probenaufarbeitung inkubiert werden. Die nicht konjugierten Plasmaflavonole (sogenannte freie Aglyca) wurden ohne diese Inkubation analysiert. Somit stellen die mit vorheriger Enzyminkubation analysierten Metaboliten keine exakt einheitlichen Moleküle dar. Für diese Metaboliten gilt die Einschränkung, dass es sich um glucuronidierte und/oder sulfatierte Derivate des jeweiligen Flavonols handelt, Aussagen zur genauen Position der konjugierten Gruppe im Molekül können nicht gemacht werden. Für eine genauere Aufklärung der Molekülstruktur wären massenspektrometrische Verfahren erforderlich (PRASAIN et al. 2004; MULLEN et al. 2006, 2008). Daher sind die berechneten pharmakokinetischen Parameter aus den Analysen der Gesamtflavonole nach Enzyminkubation auf die Summe aller Konjugate eines Flavonols bezogen und müssen auch so interpretiert werden. Diese Einschränkung gilt selbstverständlich nicht für die ohne Enzyminkubation analysierten Proben.

5.3 Plasmametaboliten von Quercetin

Bisherige Untersuchungen zu Bioverfügbarkeit und Metabolismus von Quercetin bei Mensch, Ratten und Schweinen zeigten, dass der überwiegende Teil der im Blutplasma zirkulierenden Metaboliten in konjugierter Form vorliegt (MANACH et al. 1995, 1996b; HOLLMAN et al. 1997a, 1997b; ADER et al. 2000; HUBBARD et al. 2004; WILLIAMSON und MANACH 2005). Dies konnte auch bei den hier untersuchten Hunden beobachtet werden. Der weitaus überwiegende Teil der Flavonole konnte erst nach Inkubation mit β -Glucuronidase/Sulfatase analysiert werden, also nach hydrolytischer Spaltung der konjugierten Gruppen. Aus dieser Studie sind jedoch weder Angaben über die quantitative Verteilung der Glucuronide, Sulfate und Sulfoglucuronide noch über die bevorzugte Position im Flavonolmolekül für die Konjugation ableitbar. Massenspektrometrische Untersuchungen, die solche spezifischen

Informationen liefern können, sind bislang nur bei wenigen Humanstudien durchgeführt worden. Hierbei wurden als häufigste Plasmametaboliten von Quercetin bzw. Rutin Quercetin-3-Glucuronid, Quercetin-3-Sulfat, Isorhamnetin-3-Glucuronid, ein nicht näher bestimmbares Quercetin-Diglucuronid sowie ein Quercetin-Sulfoglucuronid nachgewiesen (MULLEN et al. 2004, 2006; JAGANATH et al. 2006). Gegenwärtig kann nur spekuliert werden, ob diese Metaboliten auch bei Hunden vorkommen. Speziesunterschiede sind, wie beim Stoffwechsel anderer Fremdstoffe auch, jedoch wahrscheinlich.

Genauere Aussagen können allerdings zur Verteilung methylierter Metaboliten gemacht werden, da durch das bei der Probenaufarbeitung verwendete Enzymgemisch keine Demethylierung erfolgte. Bei Ratten machen methylierte Quercetinmetaboliten wie Isorhamnetin und Tamarixetin über die Hälfte aller im Blut zirkulierenden Quercetinmetaboliten aus (MORAND et al. 1998; GRAF et al. 2006). Bei Menschen und Schweinen jedoch machen Isorhamnetin und Tamarixetin maximal 20-25 % aller Plasmametaboliten aus, der Hauptteil entfällt hier auf Konjugate von Quercetin (MANACH et al. 1998; ADER et al. 2000; HUBBARD et al. 2004, 2006).

Auch bei den hier untersuchten Hunden war Quercetin bei allen Behandlungen mit einem Anteil von 80-90 % eindeutig der Hauptmetabolit. Die restlichen Metaboliten waren Isorhamnetin und zu einem kleinen Teil Kämpferol. Somit ist der Quercetinstoffwechsel von Hunden dem von Menschen und Schweinen nicht unähnlich, bei denen die methylierten Quercetinderivate Isorhamnetin und Tamarixetin ebenfalls nur einen maximalen Anteil von zusammen etwa 20-25 % ausmachen (ERLUND et al. 2000; ADER et al. 2000; OLTHOF et al. 2000; GRAEFE et al. 2001; CERMAK et al. 2003; HUBBARD et al. 2003; LESSER et al. 2004). Im Unterschied dazu tragen bei Ratten die meisten Plasmametaboliten von Quercetin eine Methylgruppe (MANACH et al. 1996b; MORAND et al. 1998; MULLEN et al. 2002).

Interessanterweise konnte in den Hundplasmaproben Tamarixetin nur in Spuren nachgewiesen werden. Die Methylierung an der Position 4' des Flavonoidmoleküls scheint beim Hund kaum vorzukommen. Die quantitative Verteilung der Metaboliten war bei allen applizierten Quercetinglycosiden vergleichbar, was aufgrund des Absorptionsmechanismus auch zu erwarten war. Schließlich ist die Deglycosylierung Voraussetzung für die Absorption des Flavonols. Da letztendlich immer nur Querce-

tin-Aglycon im Darm absorbiert wird, sollte auch die darauf folgende Verstoffwechslung in Darm und Leber und damit das Metabolitenmuster gleich sein.

Bemerkenswert ist ferner, dass die quantitative Verteilung der Metaboliten nach intravenöser Applikation von Quercetin anders war als nach oraler Applikation: Hier lag der Anteil von Isorhamnetin an der Gesamt-AUC bei fast 60 %. Kämpferol hatte auch hier nur einen geringen Anteil während Tamarixetin nur in Spuren nachgewiesen werden konnte. Die Beobachtung, dass bereits zum ersten Blutentnahmezeitpunkt 15 Minuten nach der Injektion die Konzentration von Isorhamnetin höher als die von Quercetin war, deutet auf eine sehr effiziente Methylierung an der C3'-Position von Quercetin in der Leber hin. Der vergleichsweise geringe Isorhamnetinanteil nach oraler Quercetinaufnahme lässt vermuten, dass der Phase II-Metabolismus des Flavonols bereits im Darmepithel sehr intensiv ist und die dort entstehenden Konjugate nicht mehr für eine weitere Methylierung zugänglich sind.

Während die Verteilung der methylierten und nicht-methylierten Metaboliten beim Hund mit Ausnahme des Tamarixetins grundsätzlich ähnlich wie bei Menschen und Schweinen ist, verdient ein Punkt jedoch besondere Aufmerksamkeit: In den allermeisten Studien, in denen Metaboliten von Quercetin nach oraler Verabreichung analysiert wurden, konnten keine freien Aglyca im Blut bzw. solche nur in Spuren nachgewiesen werden (ADER et al. 2000; GRAF et al. 2005b; MULLEN et al. 2002, 2004, 2006, 2008). Selbst im Pfortaderblut von Schweinen wurden nur Konjugate, jedoch keine freien Aglyca gefunden (CERMAK et al. 2003). Dies war bei den hier untersuchten Hunden anders. Zwar bestand auch hier der größte Teil der Metaboliten aus Konjugaten, aber auch freie Aglyca wurden in quantifizierbaren Konzentrationen gemessen. Diese Aglyca machten immerhin knapp 20 % aller Metaboliten bezogen auf die Gesamt-AUC aus. Ob dieser relativ hohe Anteil dadurch zu erklären ist, dass die Kapazität der β -Glucuronidasen und Sulfatasen in Darm und Leber von Hunden bereits bei Flavonolkonzentrationen von 10 mg/kg gesättigt ist und daher die absorbierten Flavonole nicht vollständig konjugiert werden oder ob dies andere Gründe hat, müssen weitere Untersuchungen zeigen. Denkbar wäre beispielsweise auch, das Flavonolaglyca in bestimmten Geweben kontinuierlich durch β -Glucuronidasen freigesetzt werden und in dieser Form wieder in das Blut gelangen. Eine solche Aktivität konnte nicht nur in der Leber sondern beispielsweise auch in neutrophilen Granulozyten beobachtet werden (SHIMOI et al. 2000; O'LEARY et al. 2001).

5.4 Absolute Bioverfügbarkeit von Quercetin

Die in dieser Studie ermittelte absolute Bioverfügbarkeit von Quercetin betrug nur etwa 4 %. Bei dieser Berechnung wurden auch die methylierten (Isorhamnetin) und konjugierten Flavonolmetaboliten eingeschlossen. Bezogen allein auf das unkonjugierte Aglycon wäre die Bioverfügbarkeit daher noch deutlich geringer, da die Konjugate den größten Teil der zirkulierenden Metaboliten ausmachen (siehe oben). Im Vergleich zu anderen Spezies scheint die Bioverfügbarkeit beim Hund sehr gering zu sein. Weitere Daten liegen nur für die Ratte und das Schwein vor. Danach betrug bei Ratten die absolute Verfügbarkeit, bezogen auf alle Plasmametaboliten mit intakter Flavonolstruktur einschließlich der Konjugate, bei oraler Verabreichung von Quercetin in wässriger Suspension etwa 16 % (KHALED et al. 2003). Mit 17 % wurde ein ähnlicher Wert bei Schweinen bestimmt, denen Quercetin in das Futter eingemischt worden war (ADER et al. 2000). In anderen Untersuchungen, wo verschiedenartige Hilfsstoffe zur Verbesserung der Löslichkeit des Flavonols eingesetzt wurden, konnte bei Ratten eine absolute Bioverfügbarkeit von über 50 % beobachtet werden (CHEN et al. 2005; YANG et al. 2005). Aber selbst im Vergleich mit den genannten Studien, bei denen Quercetin einfach in das Futter gemischt bzw. in Wasser suspendiert wurde (ADER et al. 2000; KHALED et al. 2003), ist die bei den Hunden bestimmte absolute Bioverfügbarkeit als sehr gering zu bewerten. Dabei muss noch berücksichtigt werden, dass die Zusammensetzung der Testmahlzeit für die Hunde bereits hinsichtlich einer hohen Verfügbarkeit ausgewählt worden war (CERMAK et al. 2003). In Übereinstimmung mit der recht geringen Verfügbarkeit lagen auch die maximalen Plasmakonzentrationen von Quercetin (einschließlich der Konjugate) nach oraler Verabreichung des Aglycons in einer Konzentration von 10 mg/kg KM im Mittel nur bei etwa 230 nmol/l.

5.5 Relative Bioverfügbarkeit verschiedener Quercetinglycoside

5.5.1 Isoquercitrin

Bei Ratten und Schweinen konnte gezeigt werden, dass nach oraler Verabreichung des 3-O-Glucosids Isoquercitrin die relative Verfügbarkeit von Quercetin um 50 % bzw. 180 % höher lag als bei Verabreichung des Aglycons selbst (MORAND et al. 2000; CERMAK et al. 2003). Die vorliegende Untersuchung ergab bei den Hunden ein ähnliches Ergebnis, hier war die relative Bioverfügbarkeit von Quercetin aus Isoquercitrin etwa 135 % höher als die aus Quercetin-Aglycon. Die maximalen Plasmakonzentrationen waren im Mittel fast viermal so hoch wie die nach Verabreichung von Quercetin-Aglycon, erreichten aber auch hier kaum Konzentrationen oberhalb von 1 $\mu\text{mol/l}$. Weiterhin fiel auf, dass die Absorption aus Isoquercitrin schneller erfolgte als die des Aglycons, was in dem signifikant kürzeren $T_{\text{max}1}$ -Wert von unter einer Stunde deutlich wird. Eine schnelle Flavonolabsorption nach Isoquercitrin-Aufnahme mit einem T_{max} -Wert von nur 30 Minuten wurde auch beim Menschen beobachtet (HOLLMAN et al. 1999). Solche kurzen T_{max} -Werte lassen eine Absorption bereits aus dem Magen möglich erscheinen. Eine quantitativ relevante Absorption aus dem Magen kann aber nach gegenwärtigem Wissensstand ausgeschlossen werden. Am Beispiel der Isoflavone Daidzein und Genistein wurde bei der Ratte gezeigt, dass zwar deren lipophile Aglyca zumindest in gewissem Umfang durch das Magenepithel absorbiert werden können, nicht jedoch deren Glycoside (PISKULA et al. 1999). Da der $T_{\text{max}1}$ -Wert nach Verabreichung des lipophilen Quercetins, für welches prinzipiell eine gastrale Absorption denkbar wäre, sogar signifikant länger als derjenige nach Fütterung seines hydrophileren 3-O-Glucosids war, muss die schnelle Absorption nach Isoquercitrin andere Ursachen als eine Absorption aus dem Magen haben. Da eine Absorption über Transportproteine wie den SGLT1 ausgeschlossen werden muss (KOTTRA und DANIEL 2007), verbleibt nach gegenwärtigem Kenntnisstand die Hypothese, dass sich das hydrophile Isoquercitrin an der Bürstensaummembran des Dünndarms anreichert und nach enzymatischer Hydrolyse ein höherer transmembranaler Konzentrationsgradient für die Diffusion des freigesetzten Quercetins entsteht (GEE et al. 2000).

Neben den deutlich höheren Plasmakonzentrationen der Metaboliten fiel auch der ausgeprägte zweite Plasmapeak ($C_{\max 2}$) ungefähr 4 Stunden nach Fütterung des Quercetinglucosids auf. Dies wurde so auch schon beim Schwein beobachtet (CERMAK et al. 2003). Nach Fütterung des Quercetin-Aglycons war ein zweiter Plasmapeak der Metaboliten nach 4 Stunden zu beobachten, der bei insgesamt deutlich niedrigeren Konzentrationen etwas weniger ausgeprägt war. Dieser zweite Peak spricht für eine enterohepatische Zirkulation. Nach Studien an der Ratte gelangen ca. 40 % der im Darm absorbierten Quercetinmetaboliten nicht in den zentralen Kreislauf, sondern werden direkt von der Leber in die Galle sezerniert (CRESPY et al. 2003). Zusammen mit den von den Enterozyten selbst resezierten Flavonolkonjugaten werden diese erst in den hinteren Darmabschnitten durch bakterielle Enzyme hydrolysiert, so dass es anschließend dort zu einer Reabsorption der freigesetzten Aglyca kommen kann. Für diese Annahme spricht der Zeitpunkt des zweiten Plasmapeaks. Deutliche Hinweise für einen solchen enterohepatischen Kreislauf wurden beispielsweise für das Flavon Baicalein sowie für das Isoflavon Biochanin A beschrieben (XING et al. 2005; MOON et al. 2006). Allerdings bestreitet eine weitere, mit Ratten durchgeführte Studie, die Existenz eines enterohepatischen Kreislaufs für Quercetin (CHEN et al. 2005).

5.5.2 Rutin

Sowohl die Flavonolabsorption aus dem Glucorhamnosid Rutin als auch die Eliminationsphase der Plasmametabolite dauerten deutlich länger als nach Verabreichung des Quercetin-Aglycons oder des 3-O-Glucosids. Die stark verzögerte Absorption von Quercetin aus Rutin bei den Hunden in dieser Studie stimmt mit früheren Beobachtungen an Menschen, Schweinen und Ratten überein (HOLLMAN 1999; ERLUND 2000; CERMAK 2003; LANDGRAF 2003). Beim Schwein erfolgte die Absorption aus Rutin zwar auch langsamer als aus dem Aglycon, T_{\max} wurde jedoch bereits nach 255 ± 45 Minuten für den Metaboliten Quercetin sowie nach spätestens 210 Minuten für Isorhamnetin und Tamarixetin erreicht. Die Elimination aller Plasmametaboliten war in dieser Studie mit Schweinen bereits nach 24 Stunden abgeschlossen (LANDGRAF 2003). Auch bei Menschen wurde eine gegenüber dem Aglycon verzögerte Absorption aus Rutin beobachtet (ERLUND 2000; HOLLMAN 1999).

Bereits in den ersten 3 Stunden nach Aufnahme von Rutin waren geringe Quercetinspiegel im Hundeplasma nachzuweisen. Dies zeigt an, dass bereits im oberen Gastrointestinaltrakt eine geringfügige Deglycosilierung des Rutins stattgefunden haben könnte. Allerdings waren im verwendeten Rutinpräparat auch Spuren von Quercetin enthalten (Daten nicht gezeigt), die zumindest einen kleinen Teil dieser frühen Absorptionsphase erklären können. Jedoch begannen erst etwa 4 Stunden nach Rutinverabreichung die Metabolitenspiegel deutlich anzusteigen. Die maximale Plasmakonzentration wurde im Mittel erst nach 11 Stunden erreicht. Dies war sogar signifikant später als der Zeitpunkt des zweiten Konzentrationsmaximums nach Gabe von Quercetin-Aglycon und Isoquercitrin. Wie bereits diskutiert, beruht dieses zweite Maximum 4 Stunden nach Isoquercitrin- bzw. Quercetin-Verabreichung wahrscheinlich auf der enterohepatischen Zirkulation von konjugierten Flavonolmetaboliten, die über die Galle den Dickdarm erreichen und dort durch bakterielle Hydrolasen freigesetzt werden. Die Beobachtung, dass die Absorption von Quercetin aus Rutin sogar noch später erfolgte, kann ein Hinweis darauf sein, dass die Dickdarmflora des carnivoren Hundes nur relativ langsam die glycosidische Bindung des Rutins spalten kann.

Dass neben der Absorptionsphase insbesondere auch die Eliminationsphase der Plasmametaboliten nach Rutin deutlich verlängert war, resultierte in einer mittleren Verweildauer (MRT) von 18 Stunden. Dies kann ebenfalls in einer langsamen Freisetzung von Quercetin aus Rutin im caninen Dickdarm begründet sein, welche zu einer lang anhaltenden Absorption des Aglycons aus diesem Darmsegment führen würde. Voraussetzung für eine solche wäre jedoch, dass das freigesetzte Aglycon nicht selbst in großem Umfang von Darmbakterien weiter degradiert wird. In einer *In-vitro*-Studie, in der der Dickdarmmetabolismus von Rutin beim Schwein untersucht wurde, stellten die Autoren fest, dass der bakterielle Abbau von Quercetin schneller erfolgte als die Freisetzung von Quercetin aus Rutin (CERMAK 2006). Danach wird wahrscheinlich der größte Teil des im Dickdarm freigesetzten Quercetins abgebaut noch bevor es in diesem Darmsegment absorbiert werden kann. Diese Beobachtung kann auch erklären, warum die relative Bioverfügbarkeit von Rutin bei den bislang untersuchten Spezies Mensch, Schwein und Ratte nur etwa 25 % derjenigen von Quercetin-Aglycon ist (CERMAK 2003; MORAND 2000; HOLLMAN 1999). Im Unterschied dazu war die relative Bioverfügbarkeit von Rutin in dieser Studie beim Hund

nicht signifikant verschieden von der Bioverfügbarkeit aus dem Quercetin-Aglycon. Zwar waren die maximalen Plasmaspiegel nach Rutin deutlich geringer als nach Fütterung des Quercetin-Aglycons, aber die Plasmametaboliten nach Rutin zirkulierten deutlich länger im Plasma, was in der signifikant längeren MRT ausgedrückt wird.

Im Vergleich zu Menschen, Schweinen haben Hunde sowohl eine kürzere intestinale Transitzeit des Chymus als auch eine geringere bakterielle Umsatzrate im Dickdarm (DAVIES 1993; DROCHNER 1991). Möglicherweise ist die Dickdarmflora dieser carnivoren Spezies schlecht an pflanzliche Flavonoide adaptiert. Dies könnte sowohl eine sehr langsame Freisetzung von Quercetin aus Rutin im Dickdarmlumen (korrespondierend zu dem T_{\max} -Wert von 11 Stunden), als auch einen nur sehr geringen bakteriellen Abbau des freigesetzten Quercetins und somit eine relativ hohe Quercetinabsorption zur Folge haben (korrespondierend mit den im Vergleich zu anderen Spezies relativ hohen AUC-Werten).

Diese Vermutung sollte in weiteren Studien untersucht werden. Insbesondere sollte geklärt werden, ob eine länger dauernde Fütterung von Rutin zu einer Adaptation der Dickdarmflora bei Hunden und dadurch zu einer schnelleren Verstoffwechselung dieses Glycosids führen kann. Als Folge davon wäre dann zwar eine schnellere Absorption, aber auch kürzere MRT-Werte und vor allem eine deutlich niedrigere Bioverfügbarkeit von Quercetin aus Rutin zu erwarten, wie sie bereits bei anderen Spezies beobachtet wurde.

Sollte eine solche Adaptation der Dickdarmflora beim Hund jedoch nicht erfolgen, wäre Rutin eine recht gute Quercetinquelle bei dieser Spezies, die in der Regel nur einmal täglich gefüttert wird. Hierbei würden durch die lange Verweildauer die Metabolitenspiegel im Plasma auf einem relativ stabilen Niveau bleiben.

5.6 Bezug der pharmakokinetischen Daten zu potentiellen *In-vivo*-Wirkungen

Bei der Beurteilung möglicher Wirkungen der Plasmametaboliten von Quercetin *in vivo* sind, unabhängig vom verwendeten Glycosid, folgende Punkte zu beachten:

1. Die absolute Bioverfügbarkeit von Quercetin ist selbst unter Einschluss aller Flavonolmetaboliten mit lediglich 4 % sehr gering, auch unter optimierten Fütterungsbedingungen.

2. Die maximalen Plasmakonzentrationen der Flavonolmetaboliten liegen bei praxisrelevanten Supplementdosierungen (10 mg Quercetin/kg KM) meist unter 1 $\mu\text{mol/l}$, auch beim relativ gut verfügbaren Isoquercitrin.

3. Bei der Mehrzahl der Flavonolmetaboliten handelt es sich um sulfatierte und/oder glucuronidierte Metaboliten, deren spezifische Wirkungen sich von denen des freien Quercetins unterscheiden können.

Die meisten der Flavonolen wie Quercetin zugeschriebenen positiven Wirkungen beruhen auf *In-vitro*-Untersuchungen, die mit dem Quercetin-Aglycon in Dosierungen oberhalb von 1 $\mu\text{mol/l}$ durchgeführt wurden. Somit können die hierbei erzielten Ergebnisse keinesfalls direkt auf die *In-vivo*-Situation extrapoliert werden.

Eine Untersuchung zur Bioverfügbarkeit von Grapefruit-Flavanonen bei Hunden verwendete eine Flavanonkonzentration von etwa 5 mg/kg KM (70 mg Gesamtdosis bei ca. 14 kg schweren Beagles). Auch in dieser Studie lagen die Plasmakonzentrationen der Metaboliten im nanomolaren Bereich. Die absolute Bioverfügbarkeit wurde jedoch nicht bestimmt (MATA-BILBAO 2007). Auch konnte in einigen Tierversuchen bereits gezeigt werden, dass Quercetin durchaus Effekte *in vivo* hervorrufen kann. So konnte eine mehrtägige orale Quercetin-Verabreichung den Blutdruck bei hypertensiven Ratten senken und bei adipösen Ratten die Plasmaspiegel von Triglyceriden, Gesamtcholesterol, freien Fettsäuren und Insulin (DUARTE et al. 2001; MACHHA und MUSTAFA 2005; SÁNCHEZ et al. 2006; YAMAMOTO und OUE 2006; EDWARDS et al. 2007; MACHHA et al. 2007a, 2007b; RIVERA et al. 2008). Studien zur Wirksamkeit von Quercetin als Futtersupplement sind auch bei Hunden nötig, um eine fundierte Aussage zu möglichen prophylaktischen oder therapeutischen Wirkungen in dieser Spezies machen zu können. Dabei sollten auch mögliche Interaktionen mit Arzneistoffen berücksichtigt werden, die hohen Quercetindosierungen in Supplementen entgegenstehen könnten.

5.7 Schlussfolgerungen

Die in dieser Untersuchung beobachtete geringe Bioverfügbarkeit von Quercetin, sein intensiver Metabolismus, insbesondere durch Konjugationsreaktionen von Phase II-Enzymen, und die nur geringen Plasmakonzentrationen der Metaboliten müssen bei der Beurteilung möglicher *In-vivo*-Effekte des Flavonols und seiner Glycoside berücksichtigt werden. Zur Beurteilung seiner prophylaktischen oder therapeutischen Wirkung sind daher kontrollierte Fütterungsstudien an Hunden unabdingbar. Da sich die postulierten Wirkungen vor allem auf chronische Erkrankungen beziehen, müssten diese Studien entsprechende Zeiträume umfassen. Unabhängig von diesen Überlegungen scheint das Quercetinglycosid Rutin für Hunde im Unterschied zu anderen Spezies, wie dem Menschen, dem Schwein oder der Ratte, eine relativ gute Quercetinquelle zu sein. Durch die lange Verweildauer seiner Metaboliten, korrespondierend mit einer jeweils langsamen Absorptions- und Eliminationsphase, sollten sich auch bei einmal täglicher Fütterung relativ konstante Plasmakonzentrationen erreichen lassen. Dies ist jedoch in weiteren Studien zu überprüfen.

6 Zusammenfassung

Marianne Reinboth

Bioverfügbarkeit des Flavonols Quercetin beim Hund

Veterinär-Physiologisches Institut der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Eingereicht im Juni 2010

79 Seiten, 20 Abbildungen, 6 Tabellen, 211 Literaturangaben, 1 Anhang

Schlüsselwörter: Quercetin, Bioverfügbarkeit, Hund, absolute Bioverfügbarkeit, Isoquercitrin, Rutin, Flavonole

Für das pflanzliche Flavonol Quercetin werden vielfältige gesundheitsfördernde Wirkungen postuliert, so auch bei Hunden. Über die Bioverfügbarkeit des Flavonols bei dieser Spezies liegen bislang jedoch keinerlei Daten vor. Daher hatte diese Arbeit das Ziel, Bioverfügbarkeit und pharmakokinetische Parameter von Quercetin und wichtigen Quercetinglycosiden bei Hunden nach deren Verabreichung mit einer Testmahlzeit in einer praxisrelevanten Dosierung von 10 mg/kg Körpermasse zu untersuchen.

Dazu erhielten 9 adulte Beagles beiderlei Geschlechts das zuckerfreie "Aglycon" Quercetin bzw. seine Glycoside Isoquercitrin (Quercetin-3-O-Glucosid) und Rutin (Quercetin-3-O-Glucorhamnosid) in jeweils äquimolarer Dosierung in einer Testmahlzeit verabreicht. Anschließend wurden Blutproben über einen Zeitraum von bis zu 72 Stunden entnommen und mittels HPLC die Konzentrations-Zeitverläufe der Metaboliten im Blutplasma, die Bioverfügbarkeit sowie weitere pharmakokinetische Parameter bestimmt. Weiterhin wurde die absolute Bioverfügbarkeit von Quercetin aus dem Vergleich einer oralen mit einer intravenösen Applikation bestimmt.

Der weitaus größte Teil der Plasmametaboliten von Quercetin sowie seiner beiden Glycoside bestand aus glucuronidierten bzw. sulfatierten Quercetinkonjugaten. Nicht konjugiertes Quercetin-Aglycon kam nur in einem Anteil von etwa 20 % vor. Neben Quercetin machten seine Metaboliten Isorhamnetin und Kämpferol weniger als 10 %

aller im Plasma zirkulierenden Flavonole aus. Die absolute Bioverfügbarkeit von Quercetin betrug nur etwa 4 %.

Die relative Bioverfügbarkeit aus dem 3-O-Glucosid Isoquercitrin war mehr als doppelt so hoch wie aus dem Aglycon, die maximalen Plasmaspiegel lagen aber auch hier unter 1 $\mu\text{mol/l}$. Sowohl nach Aufnahme von Quercetin als auch nach Isoquercitrin kam es zu einer relativ schnellen Absorption aus dem Dünndarm mit einem ersten Plasmapeak ungefähr eine Stunde nach der Ingestion. Vier Stunden nach Aufnahme der beiden Flavonole trat ein zweiter Plasmapeak auf, der in der Regel höher als der erste ausfiel. Dies deutet auf einen enterohepatischen Kreislauf der über die Galle ausgeschiedenen Metaboliten hin.

Nach Aufnahme von Rutin kam es zu einer verzögerten Absorption, da eine Deglycosylierung durch bakterielle Glycosidasen im Dickdarm Voraussetzung für die Absorption des Flavonols ist. Maximale Plasmakonzentrationen wurden im Mittel erst 11 Stunden nach Ingestion dieses Glycosids erreicht. Die maximalen Plasmakonzentrationen nach Rutin waren geringer als nach Quercetin oder Isoquercitrin, jedoch war die mittlere Verweildauer der Plasmametaboliten mit 18 Stunden auch wesentlich länger. Im Unterschied zu anderen Spezies war die relative Bioverfügbarkeit von Rutin gegenüber Quercetin nicht verringert.

Obwohl Rutin eine relativ gute Quercetinquelle für Hunde zu sein scheint, muss bei der Einschätzung möglicher *In-vivo*-Wirkungen die relativ geringe Bioverfügbarkeit sowie die intensive Metabolisierung seines Aglycons Quercetin berücksichtigt werden.

7 Summary

Marianne Reinboth

Bioavailability of the Flavonol Quercetin in Dogs

Institute of Physiology of the Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig

Submitted in June 2010

79 pages, 20 figures, 6 tables, 211 references, 1 appendix

Keywords: quercetin, bioavailability, dog, absolute bioavailability, isoquercitrin, rutin, flavonols

The plant flavonol quercetin is supposed to exert multiple health-related effects in dogs. To date no information on its bioavailability in this particular species is available. This study intended to investigate bioavailability and pharmacokinetics of quercetin and certain quercetin glycosides in dogs after ingestion of a test meal supplemented with a quercetin dose equivalent to 10 mg/kg body weight.

Nine adult beagle dogs of both sexes received the aglycon quercetin (sugarfree) or its glycosides isoquercitrin (quercetin-3-O-glucoside) and rutin (quercetin-3-O-glucorhamnoside) in equimolar amounts together with a test meal. Blood samples were taken over a period of up to 72 hours; bioavailability and pharmacokinetics were calculated from the HPLC-derived plasmaconcentration-time-curves. Absolute bioavailability was calculated by comparing an oral to an intravenous administration of quercetin.

The majority of analysed plasma metabolites were glucuronidated and sulfated conjugates of quercetin. Non-conjugated quercetin aglycon comprised only 20 %. Besides quercetin, its metabolites isorhamnetin and kaempferol made up less than 10 % of all circulating metabolites. The absolute bioavailability of quercetin was only 4 %.

The relative bioavailability of quercetin from isoquercitrin was more than twice as high than from the aglycon, but even there maximal plasma concentrations were generally less than 1 $\mu\text{mol/l}$. Absorption from the small intestine was rather fast with a first plasma peak after 1 hour after ingestion of quercetin or isoquercitrin. A second,

generally higher plasma peak occurred 4 hours after ingestion. This suggests an intensive enterohepatic recycling of biliary secreted metabolites.

Absorption was significantly delayed after ingestion of rutin due to the necessity of bacterial deglycosilation in the large intestine. Plasma concentrations peaked only after 11 hours. Plasma concentrations after rutin were lower than after quercetin or isoquercitrin, but mean residence time of plasma metabolites was as long as 18 hours after rutin ingestion. Consequently, a once daily feeding of dogs with rutin might lead to relatively constant plasma metabolite concentrations. In contrast to other species, bioavailability from rutin was not smaller than that from quercetin.

Although rutin seems to be a relative good quercetin source for dogs, estimations about potential *in-vivo*-effects of quercetin have to take into consideration its low bioavailabilty and intensive metabolism.

8 Literaturverzeichnis

Ader P, Wessmann A, Wolfram S. Bioavailability and metabolism of the flavonol quercetin in the pig. *Free Radic Biol Med.* 2000; 28(7): 1056-67.

Agullo G, GametPayrastre L, Fernandez Y, Anciaux N, Demigne C, Ramsey C. Comparative effects of flavonoids on the growth, viability and metabolism of a colonic adenocarcinoma cell line (HT29 cells). *Cancer Lett.* 1996; 105(1): 61-70.

Aherne SA, O'Brien NM. Dietary flavonols: Chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition.* 2002; 18(1): 75-81.

Anonymous. Federal Food, Drug, and Cosmetic Act. U.S. Food and Drug Administration. Chapter V, Section 505. (2004).

Aruoma OI. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *J Am Oil Chem Soc.* 1998; 75(2): 199-212.

Augustin K, Blank R, Boesch-Saadatmandi C, Frank J, Wolfram S, Rimbach G. Dietary green tea polyphenols do not affect vitamin E status, antioxidant capacity and meat quality of growing pigs. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 2008; 92(6): 705-11.

Aviram M, Fuhrman B. Polyphenolic flavonoids inhibit macrophage-mediated oxidation of LDL and attenuate atherogenesis. *Atherosclerosis.* 1998; 137: S45-S50.

Aw TY. Molecular and cellular responses to oxidative stress and changes in oxidation-reduction imbalance in the intestine. *Am J Clin Nutr.* 1999; 70(4): 557-65.

Awad HM, Boersma MG, Boeren S, van der Woude H, van Zanden J, van Bladeren PJ et al. Identification of o-quinone/quinone methide metabolites of quercetin in a cellular in vitro system. *FEBS Lett.* 2002; 520(1-3): 30-4.

Azuma K, Ippoushi K, Ito H, Higashio H, Terao J. Combination of lipids and emulsifiers enhances the absorption of orally administered quercetin in rats. *J Agric Food Chem.* 2002; 50(6): 1706-12.

Azuma K, Ippoushi K, Ito H, Horie H, Terao J. Enhancing effect of lipids and emulsifiers on the accumulation of quercetin metabolites in blood plasma after the short-term ingestion of onion by rats. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2003; 67(12): 2548-55.

Behl C, Moosmann B. Oxidative nerve cell death in Alzheimer's disease and stroke: Antioxidants as neuroprotective compounds. *Biol Chem*. 2002; 383(3-4): 521-36.

Berhow M, Vaughn SF. Higher plant flavonoids: biosynthesis and chemical ecology. In: Dashek WV, (Hrsg.). *Principles and Practices of Plant Ecology*. Boca Raton, Florida: CRC Press Inc.; 1999: pp. 425-38.

Bieger J. Verteilung des Flavonols Quercetin in Organen und Geweben beim Schwein nach mehrwöchiger Verabreichung mit dem Futter [Dissertation med. vet.]. Hannover: Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover; 2007

Bieger J, Cermak R, Blank R, de B, V, Hollman PC, Kamphues J et al. Tissue distribution of quercetin in pigs after long-term dietary supplementation. *J Nutr*. 2008; 138(8): 1417-20.

Blaut M, Schoefer L, Braune A. Transformation of flavonoids by intestinal microorganisms. *Int J Vitam Nutr Res*. 2003; 73(2): 79-87.

Bock KW, Eckle T, Ouzzine M, Fournel-Gigleux S. Coordinate induction by antioxidants of UDP-glucuronosyltransferase UGT1A6 and the apical conjugate export pump MRP2 (multidrug resistance protein 2) in Caco-2 cells. *Biochem Pharmacol*. 2000; 59(5): 467-70.

Boersma MG, van der Woude H, Bogaards J, Boeren S, Vervoort J, Cnubben NHP et al. Regioselectivity of phase II metabolism of luteolin and quercetin by UDP-glucuronosyl transferases. *Chem Res Toxicol*. 2002; 15(5): 662-70.

Böhm H, Boeing H, Hempel J, Raab B, Kroke A. Flavonols, flavones and anthocyanins as native antioxidants of food and their possible role in the prevention of chronic diseases. *Z Ernährungswiss*. 1998; 37(2): 147-63.

Bokkenheuser VD, Shackleton CHL, Winter J. Hydrolysis of Dietary Flavonoid Glycosides by Strains of Intestinal Bacteroides from Humans. *Biochem J.* 1987; 248(3): 953-6.

Bolarinwa A, Linseisen J. Validated application of a new high-performance liquid chromatographic method for the determination of selected flavonoids and phenolic acids in human plasma using electrochemical detection. *J Chromatogr B.* 2005; 823(2): 143-51.

Bors W, Michel C, Heller W, Sandermann H. Flavonoid radicals. *Free Radicals, Oxidative Stress, and Antioxidants.* 1998; 296: 85-92.

Bors W, Michel C, Schikora S. Interaction of Flavonoids with Ascorbate and Determination of Their Univalent Redox Potentials - A Pulse-Radiolysis Study. *Free Radic Biol Med.* 1995; 19(1): 45-52.

Bors W, Michel C, Stettmaier K. Antioxidant effects of flavonoids. *Biofactors.* 1997; 6(4): 399-402.

Boulton DW, Walle UK, Walle T. Extensive binding of the bioflavonoid quercetin to human plasma proteins. *J Pharm Pharmacol.* 1998; 50(2): 243-9.

Brand W, Schutte ME, Williamson G, van Zanden JJ, Cnubben NHP, Groten JP et al. Flavonoid-mediated inhibition of intestinal ABC transporters may affect the oral bioavailability of drugs, food-borne toxic compounds and bioactive ingredients. *Bio-med Pharmacother.* 2006; 60(9): 508-19.

Braune A, Gütschow M, Engst W, Blaut M. Degradation of quercetin and luteolin by *Eubacterium ramulus*. *Appl Environ Microbiol.* 2001; 67(12): 5558-67.

Bravo L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev.* 1998; 56(11): 317-33.

Bressolle F, Bromet-Petit M, Audran M. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods - application to pharmacokinetics. *J Chromatogr B.* 1996; 686: 3-10.

- Cao G, Sofic E, Prior RL. Antioxidant and Prooxidant Behavior of Flavonoids: Structure-Activity Relationships. *Free Radic Biol Med*. 1997; 22(5): 749-60.
- Cermak R. Effect of dietary flavonoids on pathways involved in drug metabolism. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2008; 4(1): 17-35.
- Cermak R, Breves G, Lüpke M, Wolffram S. *In vitro* degradation of the flavonol quercetin and of quercetin glycosides in the porcine hindgut. *Arch Anim Nutr*. 2006; 60(2): 180-9.
- Cermak R, Durazzo A, Maiani G, Böhm V, Kammerer DR, Carle R et al. The influence of postharvest processing and storage of foodstuffs on the bioavailability of flavonoids and phenolic acids. *Mol Nutr Food Res*. 2009; 53(Suppl. 2): S184-S193.
- Cermak R, Landgraf S, Wolffram S. The bioavailability of quercetin in pigs depends on the glycoside moiety and on dietary factors. *J Nutr*. 2003; 133(9): 2802-7.
- Cermak R, Landgraf S, Wolffram S. Quercetin glucosides inhibit glucose uptake into brush-border-membrane vesicles of porcine jejunum. *Br J Nutr*. 2004; 91(6): 849-55.
- Cermak R, Wolffram S. The potential of flavonoids to influence drug metabolism and pharmacokinetics by local gastrointestinal mechanisms. *Curr Drug Metab*. 2006; 7(7): 729-44.
- Chandra J, Samali A, Orrenius S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2000; 29(3-4): 323-33.
- Chen J, Lin H, Hu M. Metabolism of flavonoids via enteric recycling: role of intestinal disposition. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003; 304: 1228-35.
- Chen X, Yin OQ, Zuo Z, Chow MS. Pharmacokinetics and modeling of quercetin and metabolites. *Pharm Res*. 2005; 22(6): 892-901.
- Cheng ZQ, Radominska-Pandya A, Tephly TR. Cloning and expression of human UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A8. *Arch Biochem Biophys*. 1998; 356(2): 301-5.

Cheng ZQ, Radominska-Pandya A, Tephly TR. Studies on the substrate specificity of human intestinal UDP-glucuronosyltransferases 1A8 and 1A10. *Drug Metab Dispos.* 1999; 27(10): 1165-70.

Chopra M, Fitzsimons PEE, Strain JJT, Thurnham DI, Howard AN. Nonalcoholic red wine extract and quercetin inhibit LDL oxidation without affecting plasma antioxidant vitamin and carotenoid concentrations. *Clin Chem.* 2000; 46(8): 1162-70.

Cook NC, Samman S. Flavonoids - Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *J Nutr Biochem.* 1996; 7(2): 66-76.

Crespy V, Morand C, Besson C, Cotellet N, Vezin H, Demigne C et al. The splanchnic metabolism of flavonoids highly differed according to the nature of the compound. *Am J Physiol.* 2003; 284(6): G980-G988.

Crespy V, Morand C, Manach C, Besson C, Demigne C, Remesy C. Part of quercetin absorbed in the small intestine is conjugated and further secreted in the intestinal lumen. *Am J Physiol.* 1999; 277(1): G120-G126.

Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat Prod Rep.* 2009; 26(8): 1001-43.

Da Silva EL, Abdalla DSP, Terao J. Inhibitory effect of flavonoids on low-density lipoprotein peroxidation catalyzed by mammalian 15-lipoxygenase. *Life.* 2000; 49(4): 289-95.

Das DK. Naturally-Occurring Flavonoids - Structure, Chemistry, and High-Performance Liquid-Chromatography Methods for Separation and Characterization. 1994.

Davies B, Morris T. Physiological parameters in laboratory animals and humans. *Pharm Res.* 1993; 10(7): 1093-5.

Day AJ, Canada FJ, Diaz JC, Kroon PA, Mclauchlan R, Faulds CB et al. Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Lett.* 2000; 468(2-3): 166-70.

Day AJ, Dupont MS, Ridley S, Rhodes M, Rhodes MJC, Morgan MRA et al. Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver beta-glucosidase activity. *FEBS Lett.* 1998; 436(1): 71-5.

De Boer VCJ, Dihal AA, van der Woude H, Arts ICW, Wolffram S, Alink GM et al. Tissue distribution of quercetin in rats and pigs. *J Nutr.* 2005; 135(7): 1718-25.

De Santi C, Pietrabissa A, Mosca F, Pacifici GM. Methylation of quercetin and fisetin, flavonoids widely distributed in edible vegetables, fruits and wine, by human liver. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2002; 40(5): 207-12.

De Santi C, Pietrabissa A, Spisni R, Mosca F, Pacifici GM. Sulphation of resveratrol, a natural compound present in wine, and its inhibition by natural flavonoids. *Xenobiotica.* 2000a; 30(9): 857-66.

De Santi C, Pietrabissa A, Spisni R, Mosca F, Pacifici GM. Sulphation of resveratrol, a natural product present in grapes and wine, in the human liver and duodenum. *Xenobiotica.* 2000b; 30(6): 609-17.

Deng HT, Van Berkel GJ. Electrospray mass spectrometry and UV/visible spectrophotometry studies of Aluminum(III)-flavonoid complexes. *J Mass Spectrom.* 1998; 33(11): 1080-7.

Dresser GK, Bailey DG, Leake BF, Schwarz UI, Dawson PA, Freeman DJ et al. Fruit juices inhibit organic anion transporting polypeptide-mediated drug uptake to decrease the oral availability of fexofenadine. *Clin Pharmacol Ther.* 2002; 71(1): 11-20.

Drochner W, Meyer H. Digestion of organic matter in the large intestine of ruminants, horses, pigs and dogs. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 1991; 65(Suppl. 22): 18-40.

Duarte J, Pérez-Palencia R, Vargas F, Ocete MA, Pérez-Vizcaíno F, Zarzuelo A et al. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin in spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol.* 2001; 133(1): 117-24.

Dufour C, Dangles O. Flavonoid-serum albumin complexation: determination of binding constants and binding sites by fluorescence spectroscopy. *Biochim Biophys Acta.* 2005; 1721(1-3): 164-73.

- Duthie GG, Gardner PT, Kyle JAM. Plant polyphenols: are they the new magic bullet? *Proc Nutr Soc.* 2003; 62(3): 599-603.
- Eaton EA, Walle UK, Lewis AJ, Hudson T, Wilson AA, Walle T. Flavonoids, potent inhibitors of the human P-form phenolsulfotransferase - Potential role in drug metabolism and chemoprevention. *Drug Metab Dispos.* 1996; 24(2): 232-7.
- Edwards RL, Lyon T, Litwin SE, Rabovsky A, Symons JD, Jalili T. Quercetin reduces blood pressure in hypertensive subjects. *J Nutr.* 2007; 137(11): 2405-11.
- Erlund I, Kosonen T, Alfthan G, Maenpaa J, Perttunen K, Kenraali J et al. Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol.* 2000; 56(8): 545-53.
- Ferrali M, Signorini C, Caciotti B, Sugherini L, Ciccoli L, Giachetti D et al. Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. *FEBS Letters.* 1997; 416(2): 123-9.
- Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature.* 2000; 408(6809): 239-47.
- Fiorani M, Accorsi A, Cantoni O. Human red blood cells as a natural flavonoid reservoir. *Free Radic Res.* 2003; 37(12): 1331-8.
- Formica JV, Regelson W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol.* 1995; 33(12): 1061-80.
- Frankel EN, Kanner J, German JB, Parks E, Kinsella JE. Inhibition of Oxidation of Human Low-Density-Lipoprotein by Phenolic Substances in Red Wine. *Lancet.* 1993; 341(8843): 454-7.
- Fuchikami H, Satoh H, Tsujimoto M, Ohdo S, Ohtani H, Sawada Y. Effects of herbal extracts on the function of human organic anion-transporting polypeptide OATP-B. *Drug Metab Dispos.* 2006; 34(4): 577-82.
- Gee JM, Dupont MS, Day AJ, Plumb GW, Williamson G, Johnson IT. Intestinal transport of quercetin glycosides in rats involves both deglycosylation and interaction with the hexose transport pathway. *J Nutr.* 2000; 130(11): 2765-71.

- Geleijnse JM, Launer LJ, van der Kuip DAM, Hofman A, Witteman JCM. Inverse association of tea and flavonoid intakes with incident myocardial infarction: the Rotterdam Study. *Am J Clin Nutr*. 2002; 75(5): 880-6.
- Graefe EU, Wittig J, Mueller S, Riethling AK, Uehleke B, Drewelow B et al. Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans. *J Clin Pharm*. 2001; 41(5): 492-9.
- Graf BA, Ameho C, Dolnikowski GG, Milbury PE, Chen CY, Blumberg JB. Rat gastrointestinal tissues metabolize quercetin. *J Nutr*. 2006; 136: 39-44.
- Graf BA, Milbury PE, Blumberg JB. Flavonols, flavones, flavanones, and human health: Epidemiological evidence. *J Med Food*. 2005a; 8(3): 281-90.
- Graf BA, Mullen W, Caldwell ST, Hartley RC, Duthie GG, Lean MEJ et al. Disposition and metabolism of [2-¹⁴C]quercetin-4'-glucoside in rats. *Drug Metab Dispos*. 2005b; 33(7): 1036-43.
- Halliwell B. Health benefits of eating chocolate? *Nature*. 2003; 426: 787.
- Harborne JB, Williams CA. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*. 2000; 55(6): 481-504.
- Harris RM, Wood DM, Bottomley L, Blagg S, Owen K, Hughes PJ et al. Phytoestrogens are potent inhibitors of estrogen sulfation: Implications for breast cancer risk and treatment. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004; 89(4): 1779-87.
- Hartmann C, Massart DL, Mcdowall RD. An Analysis of the Washington Conference Report on Bioanalytical Method Validation. *J Pharm Biomed Anal*. 1994; 12(11): 1337-43.
- Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther*. 2002; 96(2-3): 67-202.
- Herrmann K. On the Occurrence of Flavonol and Flavone Glycosides in Vegetables. *Z Lebensm Unters Forsch*. 1988; 186(1): 1-5.

Herrmann K. Vorkommen und Gehalte der Flavonoide in Obst. Teil II: Flavonolglycoside, Anthocyanine und Dihydrochalcone. Erwerbsobstbau. 1990; 32(2): 32-7.

Hertog MGL, Feskens EJM, Hollman PCH, Katan MB, Kromhout D. Dietary Antioxidant Flavonoids and Risk of Coronary Heart-Disease - the Zutphen Elderly Study. Lancet. 1993a; 342(8878): 1007-11.

Hertog MGL, Hollman PCH, Katan MB, Kromhout D. Intake of Potentially Anticarcinogenic Flavonoids and Their Determinants in Adults in the Netherlands. Nutr Cancer. 1993b; 20(1): 21-9.

Hertog MGL, Hollman PCH, Vandeputte B. Content of Potentially Anticarcinogenic Flavonoids of Tea Infusions, Wines, and Fruit Juices. J Agric Food Chem. 1993c; 41(8): 1242-6.

Hertog MGL, Kromhout D, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Fidanza F et al. Flavonoid Intake and Long-Term Risk of Coronary-Heart-Disease and Cancer in the 7 Countries Study. Arch Intern Med. 1995; 155(4): 381-6.

Hollman PCH, Bijlsman MNCP, van Gameren Y, Cnossen EPJ, de Vries JHM, Katan MB. The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. Free Radic Res. 1999; 31(6): 569-73.

Hollman PCH, deVries JHM, Vanleeuwen SD, Mengelers MJB, Katan MB. Absorption of Dietary Quercetin Glycosides and Quercetin in Healthy Ileostomy Volunteers. Am J Clin Nutr. 1995; 62(6): 1276-82.

Hollman PCH, van Trijp JMP, Buysman MNCP, van der Gaag MS, Mengelers MJB, de Vries JHM et al. Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. FEBS Lett. 1997a; 418(1-2): 152-6.

Hollman PCH, vanTrijp JMP, Buysman MNCP. Fluorescence detection of flavonols in HPLC by postcolumn chelation with aluminum. Anal Chem. 1996; 68(19): 3511-5.

Hollman PCH, vanTrijp JMP, Mengelers MJB, deVries JHM, Katan MB. Bioavailability of the dietary antioxidant flavonol quercetin in man. Cancer Lett. 1997b; 114(1-2): 139-40.

Holst B, Williamson G. Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. *Curr Opin Biotechnol*. 2008; 19(2): 73-82.

Hubbard GP, Wolffram S, de Vos R, Bovy A, Gibbins JM, Lovegrove JA. Ingestion of onion soup high in quercetin inhibits platelet aggregation and essential components of the collagen-stimulated platelet activation pathway in man: a pilot study. *Br J Nutr*. 2006; 96(3): 482-8.

Hubbard GP, Wolffram S, Lovegrove JA, Gibbins JM. The role of polyphenolic compounds in the diet as inhibitors of platelet function. *Proc Nutr Soc*. 2003; 62: 469-78.

Hubbard GP, Wolffram S, Lovegrove JA, Gibbins JM. Ingestion of quercetin inhibits platelet aggregation and essential components of the collagen-stimulated platelet activation pathway in humans. *J Thromb Haemost*. 2004; 2(12): 2138-45.

Ioku K, Pongpiriyadacha Y, Konishi Y, Takei Y, Nakatani N, Terao J. beta-glucosidase activity in the rat small intestine toward quercetin monoglucosides. *Bio-sci Biotechnol Biochem*. 1998; 62(7): 1428-31.

Isbrucker RA, Edwards JA, Wolz E, Davidovich A, Bausch J. Safety studies on epigallocatechin gallate (EGCG) preparations. Part 2: Dermal, acute and short-term toxicity studies. *Food Chem Toxicol*. 2006; 44(5): 636-50.

Jaganath IB, Mullen W, Edwards CA, Crozier A. The relative contribution of the small and large intestine to the absorption and metabolism of rutin in man. *Free Radic Res*. 2006; 40(10): 1035-46.

Ji LL, Leichtweis S. Exercise and oxidative stress: Sources of free radicals and their impact on antioxidant systems. *Age*. 1997; 20(2): 91-106.

Jovanovic SV, Steenken S, Hara Y, Simic MG. Reduction potentials of flavonoid and model phenoxyl radicals. Which ring in flavonoids is responsible for antioxidant activity? *J Chem Soc Perkin 2*. 1996;(11): 2497-504.

Kandaswami C, Middleton E. Free Radical Scavenging and Antioxidant Activity of Plant Flavonoids. *Free Radicals in Diagnostic Medicine - A Systems Approach to Laboratory Technology, Clinical Correlations, and Antioxidant Therapy*. 1994; 366: 351-76.

Karnes HT, Shiu G, Shah VP. Validation of Bioanalytical Methods. *Pharm Res*. 1991; 8(4): 421-6.

Kawai Y, Nishikawa T, Shiba Y, Saito S, Murota K, Shibata N et al. Macrophage as a target of quercetin glucuronides in human atherosclerotic arteries - Implication in the anti-atherosclerotic mechanism of dietary flavonoids. *J Biol Chem*. 2008; 283(14): 9424-34.

Khaled KA, El-Sayed YM. High performance liquid chromatographic assay for the determination of quercetin in plasma. *J Liq Chromatogr Relat Techno*. 2000; 23(3): 455-65.

Khaled KA, El-Sayed YM, Al-Hadiya BM. Disposition of the flavonoid quercetin in rats after single intravenous and oral doses. *Drug Dev Ind Pharm*. 2003; 29(4): 397-403.

Khan AU, Wilson T. Reactive Oxygen Species As Cellular Messengers. *Chem Biol*. 1995; 2(7): 437-45.

Kim DH, Jung EA, Sohng IS, Han JA, Kim TH, Han MJ. Intestinal bacterial metabolism of flavonoids and its relation to some biological activities. *Arch Pharm Res*. 1998; 21(1): 17-23.

Kim DH, Kim SY, Park SY, Han MJ. Metabolism of quercitrin by human intestinal bacteria and its relation to some biological activities. *Biol Pharm Bull*. 1999; 22(7): 749-51.

Knekt P, Kumpulainen J, Jarvinen R, Rissanen H, Heliovaara M, Reunanen A et al. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr*. 2002; 76(3): 560-8.

Knekt P, Reunanen A, Jarvinen R, Maatela J. Flavonoid intake and coronary mortality - Reply. *Br Med J*. 1996; 312(7044): 1480.

- Kottra G, Daniel H. Flavonoid glycosides are not transported by the human Na⁺/glucose transporter when expressed in *Xenopus laevis* oocytes, but effectively inhibit electrogenic glucose uptake. J Pharmacol Exp Ther. 2007; 322: 829-35.
- Kroon PA, Clifford MN, Crozier A, Day AJ, Donovan JL, Manach C et al. How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro. Am J Clin Nutr. 2004; 80: 15-21.
- Kühnau J. The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. World Rev Nutr Diet. 1976; 24: 117-91.
- Kuhnle GGC, Spencer JPE, Schroeter H, Shenoy B, Debnam ES, Srai SKS et al. Epicatechin and catechin are O-methylated and glucuronidated in the small intestine. Biochem Biophys Res Commun. 2000; 277(2): 507-12.
- Labib S, Erb A, Kraus M, Wickert T, Richling E. The pig caecum model: a suitable tool to study the intestinal metabolism of flavonoids. Mol Nutr Food Res. 2004; 48(4): 326-32.
- Landgraf S. Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit und intestinalen Absorption von Quercetin und Quercetinglycosiden [Dissertation oec. troph.]. Kiel: Christian-Albrechts-Universität zu Kiel; 2003.
- Lesser S, Cermak R, Wolffram S. Bioavailability of quercetin in pigs is influenced by the dietary fat content. J Nutr. 2004; 134(6): 1508-11.
- Lesser S, Cermak R, Wolffram S. The fatty acid pattern of dietary fat influences the oral bioavailability of the flavonol quercetin in pigs. Br J Nutr. 2006; 96(6): 1047-52.
- Linseisen J, Radtke J, Wolfram G. Flavonoid intake of adults in a Bavarian subgroup of the national food consumption survey. Z Ernährungswiss. 1997; 36(4): 403-12.
- Liu B, Anderson D, Ferry DR, Seymour LW, deTakats PG, Kerr DJ. Determination of Quercetin in Human Plasma Using Reversed-Phase High-Performance Liquid-Chromatography. J Chromatogr B. 1995; 666(1): 149-55.

Lotito SB, Frei B. The increase in human plasma antioxidant capacity after apple consumption is due to the metabolic effect of fructose on urate, not apple-derived antioxidant flavonoids. *Free Radic Biol Med*. 2004; 37(2): 251-8.

Machha A, Achike FI, Mohd MA, Mustafa MR. Baicalein impairs vascular tone in normal rat aortas: role of superoxide anions. *Eur J Pharmacol*. 2007a; 565: 144-50.

Machha A, Achike FI, Mustafa AM, Mustafa MR. Quercetin, a flavonoid antioxidant, modulates endothelium-derived nitric oxide bioavailability in diabetic rat aortas. *Nitric Oxide*. 2007b; 16: 442-7.

Machha A, Mustafa MR. Chronic treatment with flavonoids prevents endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rat aorta. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2005; 46(1): 36-40.

Manach C, Morand C, Crespy V, Demigne C, Texier O, Regerat F et al. Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties. *FEBS Lett*. 1998; 426(3): 331-6.

Manach C, Morand C, Demigne C, Texier O, Regerat F, Remesy C. Bioavailability of rutin and quercetin in rats. *FEBS Lett*. 1997; 409(1): 12-6.

Manach C, Morand C, Texier O, Favier ML, Agullo G, Demigné C et al. Quercetin metabolites in plasma of rats fed diets containing rutin or quercetin. *J Nutr*. 1995; 125: 1911-22.

Manach C, Regerat F, Texier O, Agullo G, Demigne C, Remesy C. Bioavailability, metabolism and physiological impact of 4-oxo-flavonoids. *Nutr Res*. 1996a; 16(3): 517-44.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*. 2004; 79(5): 727-47.

Manach C, Texier O, Regerat F, Agullo G, Demigne C, Remesy C. Dietary quercetin is recovered in rat plasma as conjugated derivatives of isorhamnetin and quercetin. *J Nutr Biochem*. 1996b; 7(7): 375-80.

Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Remesy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Amer J Clin Nutr*. 2005; 81(1): 230S-42S.

Mata-Bilbao MD, Andres-Lacueva C, Roura E, Jaduregui O, Escriban E, Torre C et al. Absorption and pharmacokinetics of grapefruit flavanones in beagles. *Br J Nutr*. 2007; 98(1): 86-92.

McAnulty SR, McAnulty LS, Nieman DC, Quindry JC, Hosick PA, Hudson MH et al. Chronic quercetin ingestion and exercise-induced oxidative damage and inflammation. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2008; 33(2): 254-62.

Middleton E, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev*. 2000; 52(4): 673-751.

Miura Y, Chiba T, Miura S, Tomita I, Umegaki K, Ikeda M et al. Green tea polyphenols (flavan 3-ols) prevent oxidative modification of low density lipoproteins: An ex vivo study in humans. *J Nutr Biochem*. 2000; 11(4): 216-22.

Moon YJ, Sagawa K, Frederick K, Zhang S, Morris ME. Pharmacokinetics and bioavailability of the isoflavone biochanin A in rats. *AAPS J*. 2006; 8(3): E433-E442.

Morand C, Crespy V, Manach C, Besson C, Demigne C, Remesy C. Plasma metabolites of quercetin and their antioxidant properties. *Am J Physiol*. 1998; 44(1): R212-R219.

Morand C, Manach C, Crespy V, Remesy C. Quercetin 3-O-beta-glucoside is better absorbed than other quercetin forms and is not present in rat plasma. *Free Radic Res*. 2000; 33(5): 667-+.

Morris ME, Zhang SZ. Flavonoid-drug interactions: Effects of flavonoids on ABC transporters. *Life Sci*. 2006; 78(18): 2116-30.

Movileanu L, Neagoe I, Flonta ML. Interaction of the antioxidant flavonoid quercetin with planar lipid bilayers. *Int J Pharm*. 2000; 205(1-2): 135-46.

Mukamal KJ, Maclure M, Muller JE, Sherwood JB, Mittleman MA. Tea consumption and myocardial mortality after acute infarction. *Circulation*. 2002; 105(21): 2476-81.

Mullen W, Boitier A, Stewart AJ, Crozier A. Flavonoid metabolites in human plasma and urine after the consumption of red onions: analysis by liquid chromatography with photodiode array and full scan tandem mass spectrometric detection. *J Chromatogr A*. 2004; 1058(1-2): 163-8.

Mullen W, Edwards CA, Crozier A. Absorption, excretion and metabolite profiling of methyl-, glucuronyl-, glucosyl- and sulpho-conjugates of quercetin in human plasma and urine after ingestion of onions. *Br J Nutr*. 2006; 96(1): 107-16.

Mullen W, Graf BA, Caldwell ST, Hartley RC, Duthie GG, Edwards CA et al. Determination of flavonol metabolites in plasma and tissues of rats by HPLC-radiocounting and tandem mass spectrometry following oral ingestion of [2-C-14]quercetin-4' glucoside. *J Agric Food Chem*. 2002; 50(23): 6902-9.

Mullen W, Rouanet JM, Auger C, Teissedre PL, Caldwell ST, Hartley RC et al. Bioavailability of [2-C-14]Quercetin-4'-glucoside in Rats. *J Agric Food Chem*. 2008; 56(24): 12127-37.

Murota K, Terao J. Quercetin appears in the lymph of unanesthetized rats as its phase II metabolites after administered into the stomach. *FEBS Lett*. 2005; 579: 5343-6.

Németh K, Plumb GW, Berrin JG, Juge N, Jacob R, Naim HY et al. Deglycosylation by small intestinal epithelial cell α -glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. *Eur J Nutr*. 2003; 42(1): 29-42.

O'Leary KA, Day AJ, Needs PW, Mellon FA, O'Brien NM, Williamson G. Metabolism of quercetin-7- and quercetin-3-glucuronides by an in vitro hepatic model: the role of human beta-glucuronidase, sulfotransferase, catechol-O-methyltransferase and multi-resistant protein 2 (MRP2) in flavonoid metabolism. *Biochem Pharmacol*. 2003; 65(3): 479-91.

- O'Leary KA, Day AJ, Needs PW, Sly WS, O'Brien NM, Williamson G. Flavonoid glucuronides are substrates for human liver beta-glucuronidase. *FEBS Lett.* 2001; 503(1): 103-6.
- Okamoto T. Safety of quercetin for clinical application (Review). *Int J Mol Med.* 2005; 16(2): 275-8.
- Olthof MR, Hollman PCH, Buijsman MNCP, van Amelsvoort JMM, Katan MB. Chlorogenic acid, quercetin-3-rutinoside and black tea phenols are extensively metabolized in humans (vol 133, pg 1806, 2003). *J Nutr.* 2003; 133(8): 2692.
- Olthof MR, Hollman PCH, Vree TB, Katan MB. Bioavailabilities of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside do not differ in humans. *J Nutr.* 2000; 130(5): 1200-3.
- Otake Y, Nolan AL, Walle UK, Walle T. Quercetin and resveratrol potently reduce estrogen sulfotransferase activity in normal human mammary epithelial cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2000; 73(5): 265-70.
- Pannala AS, Chan TS, O'Brien PJ, Rice-Evans CA. Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: Fast reaction kinetics. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 282(5): 1161-8.
- Petri N, Tannergren C, Holst B, Mellon FA, Bao YP, Plumb GW et al. Absorption/metabolism of sulforaphane and quercetin, and regulation of phase II enzymes, in human jejunum in vivo. *Drug Metab Dispos.* 2003; 31(6): 805-13.
- Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod.* 2000; 63(7): 1035-42.
- Piskula MK, Terao J. Accumulation of (-)-epicatechin metabolites in rat plasma after oral administration and distribution of conjugation enzymes in rat tissues. *J Nutr.* 1998; 128(7): 1172-8.
- Piskula MK, Yamakoshi J, Iwai Y. Daidzein and genistein but not their glucosides are absorbed from the rat stomach. *FEBS Lett.* 1999; 447(2-3): 287-91.
- Prasain JK, Wang CC, Barnes S. Mass spectrometric methods for the determination of flavonoids in biological samples. *Free Radic Biol Med.* 2004; 37(9): 1324-50.

Price KR, Rhodes MJC. Analysis of the major flavonol glycosides present in four varieties of onion (*Allium cepa*) and changes in composition resulting from autolysis. *J Sci Food Agr*. 1997; 74(3): 331-9.

Radomska-Pandya A, Little JM, Pandya JT, Tephly TR, King DC, Barone GW et al. UDP-glucuronosyltransferases in human intestinal mucosa. *Biochim Biophys Acta*. 1998; 1394: 199-208.

Rechner AR, Smith MA, Kuhnle GGC, Gibson GR, Debnam ES, Srai SKS et al. Colonic metabolism of dietary polyphenols: influence of structure on microbial fermentation products. *Free Radic Biol Med*. 2004; 36(2): 212-25.

Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids (vol 20, pg 933, 1996). *Free Radic Biol Med*. 1996; 21(3): 417.

Rietjens IMCM, Boersma MG, de Haan L, Spenkelink B, Awad HM, Cnubben NHP et al. The pro-oxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2002; 11(3-4): 321-33.

Rivera L, Morón R, Sánchez M, Zarzuelo A, Galisteo M. Quercetin ameliorates metabolic syndrome and improves the inflammatory status in obese Zucker rats. *Obesity*. 2008; 16(9): 2081-7.

Roggi C, Simonetti P, Maccarini L, Merlo E, Brusamolino A, Pellegrini N et al. [Antioxidants in the diet of a general population]. *Ann Ig*. 1996; 8(5): 547-57.

Sahu SC, Gray GC. Pro-oxidant activity of flavonoids: Effects on glutathione and glutathione S-transferase in isolated rat liver nuclei. *Cancer Lett*. 1996; 104(2): 193-6.

Saija A, Scalese M, Lanza M, Marzullo D, Bonina F, Castelli F. Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. *Free Radic Biol Med*. 1995; 19(4): 481-6.

Salas A, Subirada F, Perez-Enciso M, Blanch F, Jeusette I, Romano V et al. Plant Polyphenol Intake Alters Gene Expression in Canine Leukocytes. *J Nutrigenet Nutrigenomics*. 2009; 2(1): 43-52.

Salunkhe DK, Chavan JK, Kadam SS. Plant phenolics: structure, classification, and biosynthesis. In: Salunkhe DK, (Hrsg.). Dietary Tannins: Consequences and Remedies. Boca Raton, Florida: CRC Press Inc.; 1990:pp. 5-25.

Sampson L, Rimm E, Hollman PCH, de Vries JHM, Katan MB. Flavonol and flavone intakes in US health professionals. J Am Diet Assoc. 2002; 102(10): 1414-20.

Sánchez M, Galisteo M, Vera R, Villar IC, Zarzuelo A, Tamargo J et al. Quercetin downregulates NADPH oxidase, increases eNOS activity and prevents endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. J Hypertens. 2006; 24: 75-84.

Satoh H, Yamashita F, Tsujimoto M, Murakami H, Koyabu N, Ohtani H et al. Citrus juices inhibit the function of human organic anion-transporting polypeptide OATP-B. Drug Metabol Dispos. 2005; 33(4): 518-23.

Scalbert A, Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. J Nutr. 2000; 130(8): 2073S-85S.

Schneider H, Blaut M. Anaerobic degradation of flavonoids by *Eubacterium ramulus*. Arch Microbiol. 2000; 173: 71-5.

Schneider H, Schwiertz A, Collins MD, Blaut M. Anaerobic transformation of quercetin-3-glucoside by bacteria from the human intestinal tract. Arch Microbiol. 1999; 171(2): 81-91.

Scholz S, Williamson G. Interactions affecting the Bioavailability of dietary polyphenols in vivo. Int J Vitam Nutr Res. 2007; 77(3): 224-35.

Schümann K, Elsenhans B, Gordon D, Livesey G, Schlemmer U. Bioavailability '93: Different aspects of 'bioavailability' in perspective. Br J Nutr. 1994; 72(6): 950-2.

Sengupta B, Sengupta PK. The interaction of quercetin with human serum albumin: a fluorescence spectroscopic study. Biochem Biophys Res Commun. 2002; 299(3): 400-3.

Serafini M, Bugianesi R, Maiani G, Valtuena S, De Santis S, Crozier A. Plasma antioxidants from chocolate. Nature. 2003; 424: 1013.

Sesink ALA, Arts ICW, De Boer VCJ, Breedveld P, Schellens JHM, Hollman PCH et al. Breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) limits net intestinal uptake of quercetin in rats by facilitating apical efflux of glucuronides. *Mol Pharmacol*. 2005; 67(6): 1999-2006.

Sesink ALA, Arts ICW, Faassen-Peters M, Hollman PCH. Intestinal uptake of quercetin-3-glucoside in rats involves hydrolysis by lactase phlorizin hydrolase. *J Nutr*. 2003; 133(3): 773-6.

Shimoi K, Saka N, Kaji K, Nozawa R, Kinae N. Metabolic fate of luteolin and its functional activity at focal site. *Biofactors*. 2000; 12(1-4): 181-6.

Shirley BW. Flavonoid biosynthesis: 'New' functions for an 'old' pathway. *Trends Plant Sci*. 1996; 1(11): 377-82.

Skibola CF, Smith MT. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radic Biol Med*. 2000; 29(3-4): 375-83.

Spencer JPE, Chowrimootoo G, Choudhury R, Debnam ES, Srai SKS, Rice-Evans CA. The small intestine can both absorb and glucuronidate luminal flavonoids. *FEBS Lett*. 1999; 458(2): 224-30.

Sugatani J, Yamakawa K, Tonda E, Nishitani S, Yoshinari K, Degawa M et al. The induction of human UDP-glucuronosyltransferase 1A1 mediated through a distal enhancer module by flavonoids and xenobiotics. *Biochem Pharmacol*. 2004; 67(5): 989-1000.

Sun XY, Plouzek CA, Henry JP, Wang TTY, Phang JM. Increased UDP-glucuronosyltransferase activity and decreased prostate specific antigen production by biochanin A in prostate cancer cells. *Cancer Res*. 1998; 58(11): 2379-84.

Terao J, Yamaguchi S, Shirai M, Miyoshi M, Moon JH, Oshima S et al. Protection by quercetin and quercetin 3-O-beta-glucuronide of peroxynitrite-induced antioxidant consumption in human plasma low-density lipoprotein. *Free Radic Res*. 2001; 35(6): 925-31.

Treutter D. Significance of flavonoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis. *Plant Biol.* 2005; 7(6): 581-91.

Ueno I, Nakano N, Hirono I. Metabolic fate of [¹⁴C]quercetin in the ACI rat. *Jpn J Exp Med.* 1983; 53: 41-50.

van Acker SABE, van Balen GP, van den Berg DJ, Bast A, van der Vijgh WJF. Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids. *Biochem Pharmacol.* 1998; 56(8): 935-43.

van der Logt EMJ, Roelofs HMJ, Nagengast FM, Peters WHM. Induction of rat hepatic and intestinal UDP-glucuronosyltransferases by naturally occurring dietary anti-carcinogens. *Carcinogenesis.* 2003; 24(10): 1651-6.

van der Woude H, Awad HM, Boersma MG, Boeren S, van Zanden J, van Bladeren PJ et al. Quinones/quinone methides as reactive intermediates in the pro-oxidant chemistry and toxicity of dietary quercetin. *Free Radic Res.* 2002; 36: 103-4.

van Dijk C, Driessen AJM, Recourt K. The uncoupling efficiency and affinity of flavonoids for vesicles. *Biochem Pharmacol.* 2000; 60(11): 1593-600.

van Acker SABE, van den Berg DJ, Tromp MNJL, Griffioen DH, VanBennekomp WP, van der Vijgh WJF et al. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine.* 1996; 20(3): 331-42.

Walle T, Walle UK, Halushka PV. Carbon dioxide is the major metabolite of quercetin in humans. *J Nutr.* 2001; 131: 2648-52.

Walle UK, Walle T. Induction of human UDP-glucuronosyltransferase UGT1A1 by flavonoids-structural requirements. *Drug Metabol Dispos.* 2002; 30(5): 564-9.

Wang YH, Chao PDL, Hsiu SL, Wen KC, Hou YC. Lethal quercetin-digoxin interaction in pigs. *Life Sci.* 2004; 74(10): 1191-7.

Welton AF, Hurley J, Will P. Flavonoids and arachidonic acid metabolism. *Prog Clin Biol Res.* 1988; 280: 301-12.

Wiczowski W, Romaszko J, Bucinski A, Szawara-Nowak D, Honke J, Zielinski H et al. Quercetin from shallots (*Allium cepa* L. var. *aggregatum*) is more bioavailable than its glucosides. *J Nutr*. 2008; 138(5): 885-8.

Williamson G, Barron D, Shimoi K, Terao J. *In vitro* biological properties of flavonoid conjugates found *in vivo*. *Free Radic Res*. 2005; 39(5): 457-69.

Williamson G, Manach C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *Am J Clin Nutr*. 2005; 81(1): 243S-55S.

Wiseman SA, Balentine DA, Frei B. Antioxidants in tea. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 1997; 37(8): 705-18.

Xing J, Chen X, Zhong D. Absorption and enterohepatic circulation of baicalin in rats. *Life Sci*. 2005; 78(2): 140-6.

Yamamoto Y, Oue E. Antihypertensive effect of quercetin in rats fed with a high-fat high-sucrose diet. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2006; 70: 933-9.

Yang CS, Sang SM, Lambert JD, Lee MJ. Bioavailability issues in studying the health effects of plant polyphenolic compounds. *Mol Nutr Food Res*. 2008; 52: S139-S151.

Yang CY, Hsiu SL, Wen KC, Lin SP, Tsai SY, Hou YC et al. Bioavailability and metabolic pharmacokinetics of rutin and quercetin in rats. *J Food Drug Anal*. 2005; 13(3): 244-50.

Zhu BT, Ezell EL, Liehr JG. Catechol-O-methyltransferase-catalyzed rapid O-methylation of mutagenic flavonoids. *J Biol Chem*. 1994; 269(1): 292-9.

Zsila F, Bikadi Z, Simonyi M. Probing the binding of the flavonoid, quercetin to human serum albumin by circular dichroism, electronic absorption spectroscopy and molecular modelling methods. *Biochem Pharmacol*. 2003; 65(3): 447-56.

Teile dieser Arbeit wurden bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Reinboth, M., Wolfram, S., Abraham, G., Ungemach, F.R., Cermak, R. Oral bioavailability of quercetin from different quercetin glycosides in dogs. Br J Nutr. 2010; 104 (2): 198-203.

9 Anhang

9.1 HPLC-Chemikalien und -Lösungsmittel

- Rhamnetin Rotichrom® HPLC Grade
- Isorhamnetin Rotichrom® HPLC Grade
- Quercetin Rotichrom® HPLC Grade
- Kämpferol Rotichrom® HPLC Grade
- Tamarixetin HPLC Grade
- Aceton HPLC Grade
- Acetonitril HPLC Grade
- Methanol HPLC Grade
- Orthophosphorsäure (85 %, reinst)
- Salzsäure (≥ 32 %, *pro analysi*, ISO)
- Essigsäure (100 %, *pro analysi*)
- Essigsäure (0,583 mol/l) für Eichreihen und Proben
- Essigsäure (1molar, in Aqua bidest angesetzt) für den Aluminium-Nitrat-Reagenten
- Aqua bidest, Wasser Rotisolv® HPLC Gradient Grade

alle von von Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG, D-76185 Karlsruhe

- Reinstwasser aus Purelab™ Plus-Filteranlage
- β -Glucuronidase aus *Helix pomatia* Typ H-1 (β -Glucuronidase-Aktivität ≥ 300.000 Einheiten/g, Sulfatase-Aktivität ≥ 14.400 Einheiten/g) von Fa. Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, D-89555 Steinheim
- Aluminium-Nitrat-Nonahydrat (*purum, pro analysi*, ≥ 98 %) von Fa. Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, D-89555 Steinheim
- Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat *pro analysi* von Fa. E. Merck, D-64271 Darmstadt

9.2 Validierung der HPLC-Methode

Tabelle A1: Genauigkeit und Präzision der Quercetin-Bestimmung innerhalb eines HPLC-Analyselaufs („intraday“)

Nominale Konzentration (µg/l)	Mittelwert der Plasmaprobe (µg/l)	RSD (%)	RE (%)
209,18	176,3	9,5	-15,7
104,59	92,4	5,8	-11,7
52,29	39,2	3,2	-25,0
13,07	9,5	3,7	-27,3
3,27	2,8	2,9	-14,5
0,82	0,9	22,1	6,9

Die nominale Konzentration bezieht sich auf die methanolische Referenz. Die Präzision ist angegeben als RSD (relative Standardabweichung) der gemessenen Plasmaproben. Die Genauigkeit ist angegeben als prozentuale Abweichung RE (relativer Fehler) von der Nominalkonzentration; n = 6 für methanolische Referenz- und Plasmaproben.

Tabelle A2: Genauigkeit und Präzision der Isorhamnetin-Bestimmung innerhalb eines HPLC-Analyselaufts („intraday“)

Nominale Konzentration (µg/l)	Mittelwert der Plasmaprobe (µg/l)	RSD (%)	RE (%)
209,18	190,6	9,5	-8,9
104,59	100,0	6,3	-4,3
52,29	42,6	2,8	-18,6
13,07	10,4	6,0	-20,1
3,27	3,0	2,0	-9,0
0,82	0,7	9,1	-16,2

Die nominale Konzentration bezieht sich auf die methanolische Referenz. Die Präzision ist angegeben als RSD (relative Standardabweichung) der gemessenen Plasmaproben. Die Genauigkeit ist angegeben als prozentuale Abweichung RE (relativer Fehler) von der Nominalkonzentration; n = 6 für methanolische Referenz- und Plasmaproben.

Tabelle A3: Genauigkeit und Präzision der Kämpferol-Bestimmung innerhalb eines HPLC-Analyselaufts („intraday“)

Nominale Konzentration (µg/l)	Mittelwert der Plasmaprobe (µg/l)	RSD (%)	RE (%)
209,18	192,3	8,2	-8,1
104,59	99,6	5,1	-4,8
52,29	42,4	2,6	-18,9
13,07	10,5	2,6	-20,0
3,27	2,8	2,5	-13,4
0,82	0,7	8,8	-17,9
0,20	0,2	8,2	2,3

Die nominale Konzentration bezieht sich auf die methanolische Referenz. Die Präzision ist angegeben als RSD (relative Standardabweichung) der gemessenen Plasmaproben. Die Genauigkeit ist angegeben als prozentuale Abweichung RE (relativer Fehler) von der Nominalkonzentration; n = 6 für methanolische Referenz- und Plasmaproben.

Tabelle A4: Genauigkeit und Präzision der Tamarixetin-Bestimmung innerhalb eines HPLC-Analyselaufrs („intraday“)

Nominale Konzentration (µg/l)	Mittelwert der Plasmaprobe (µg/l)	RSD (%)	RE (%)
209,18	187,5	6,9	-10,4
104,59	98,4	5,4	-5,9
52,29	42,9	3,3	-18,0
13,07	10,3	4,2	-21,4
3,27	2,8	4,7	-15,5
0,82	0,7	13,5	-20,5

Die nominale Konzentration bezieht sich auf die methanolische Referenz. Die Präzision ist angegeben als RSD (relative Standardabweichung) der gemessenen Plasmaproben. Die Genauigkeit ist angegeben als prozentuale Abweichung RE (relativer Fehler) von der Nominalkonzentration; n = 6 für methanolische Referenz- und Plasmaproben.

Tabelle A5: Präzision und Genauigkeit der Quercetin-Bestimmung zwischen verschiedenen HPLC-Analyseläufen („interday“)

Nominale Konzentration (µg/l)	Mittelwert der Plasmaprobe (µg/l)	RSD (%)	RE (%)
418,36	308,2	4,5	-26,3
209,18	156,2	8,6	-25,3
104,59	77,4	7,5	-26,0
52,29	37,9	16,9	-27,5
13,07	10,0	15,1	-23,3
3,27	2,5	11,5	-22,4
0,82	0,7	13,8	-13,8

Die nominale Konzentration bezieht sich auf die methanolische Referenz. Die Präzision ist angegeben als RSD (relative Standardabweichung) der gemessenen Plasmaproben. Die Genauigkeit ist angegeben als prozentuale Abweichung RE (relativer Fehler) von der Nominalkonzentration; n = 5 für methanolische Referenz- und Plasmaproben.

Tabelle A6: Präzision und Genauigkeit der Isorhamnetin-Bestimmung zwischen verschiedenen HPLC-Analyseläufen („interday“)

Nominale Konzentration (µg/l)	Mittelwert der Plasmaprobe (µg/l)	RSD (%)	RE (%)
418,36	341,4	6,2	-18,4
209,18	182,0	6,8	-13,0
104,59	88,0	6,5	-15,8
52,29	42,1	17,2	-19,5
13,07	11,7	13,5	-10,5
3,27	2,8	9,4	-14,2
0,82	0,8	13,0	-7,8
0,41	0,4	5,3	-5,8

Die nominale Konzentration bezieht sich auf die methanolische Referenz. Die Präzision ist angegeben als RSD (relative Standardabweichung) der gemessenen Plasmaproben. Die Genauigkeit ist angegeben als prozentuale Abweichung RE (relativer Fehler) von der Nominalkonzentration; n = 5 für methanolische Referenz- und Plasmaproben.

Tabelle A7: Präzision und Genauigkeit der Kämpferol-Bestimmung zwischen verschiedenen HPLC-Analyseläufen („interday“)

Nominale Konzentration (µg/l)	Mittelwert der Plasmaprobe (µg/l)	RSD (%)	RE (%)
418,36	352,3	2,8	-15,8
209,18	181,8	6,8	-13,1
104,59	91,1	5,5	-12,9
52,29	43,7	16,0	-16,4
13,07	11,6	11,6	-11,6
3,27	2,9	9,2	-10,9
0,82	0,8	11,4	-2,8
0,41	0,4	3,7	1,1
0,20	0,2	7,3	18,1

Die nominale Konzentration bezieht sich auf die methanolische Referenz. Die Präzision ist angegeben als RSD (relative Standardabweichung) der gemessenen Plasmaproben. Die Genauigkeit ist angegeben als prozentuale Abweichung RE (relativer Fehler) von der Nominalkonzentration; n = 5 für methanolische Referenz- und Plasmaproben.

Tabelle A8: Präzision und Genauigkeit der Tamarixetin-Bestimmung zwischen verschiedenen HPLC-Analyseläufen („interday“)

Nominale Konzentration (µg/l)	Mittelwert der Plasmaprobe (µg/l)	RSD (%)	RE (%)
418,36	359,4	7,1	-14,1
209,18	180,3	6,1	-13,8
104,59	88,1	4,9	-15,8
52,29	41,7	14,6	-20,3
13,07	11,2	14,5	-14,6
3,27	2,8	9,4	-14,8
0,82	0,7	21,3	-8,9

Die nominale Konzentration bezieht sich auf die methanolische Referenz. Die Präzision ist angegeben als RSD (relative Standardabweichung) der gemessenen Plasmaproben. Die Genauigkeit ist angegeben als prozentuale Abweichung RE (relativer Fehler) von der Nominalkonzentration; n = 5 für methanolische Referenz- und Plasmaproben.

Tabelle A9: Wiederfindung der analysierten Flavonole inklusive Rhamnetin

Nominal-Konzentration (µg/l)	Quercetin	Kämpferol	Isorhamnetin	Tamarixetin	Rhamnetin
209,18	84 ± 9	92 ± 8	91 ± 9	90 ± 7	87 ± 9
104,59	88 ± 6	95 ± 5	96 ± 6	94 ± 5	95 ± 6
52,29	75 ± 3	81 ± 3	81 ± 3	82 ± 3	79 ± 2
13,07	73 ± 4	80 ± 3	80 ± 6	79 ± 4	80 ± 6
3,27	86 ± 3	87 ± 2	91 ± 2	85 ± 5	81 ± 3
0,82	107 ± 22	82 ± 9	84 ± 9	80 ± 13	83 ± 8
0,20	(≤ LOQ)	102 ± 8	103 ± 9	(≤ LOQ)	74 ± 10

Die nominale Konzentration bezieht sich auf die methanolische Referenz. Die Wiederfindung ist angegeben als Mittelwerte und Standardabweichung in % der den Leerplasmaproben zugesetzten Flavonolkonzentration von der Nominalkonzentration; n = 6 für methanolische Referenz- und Plasmaproben.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Rainer Cermak für die Überlassung dieses interessanten Themas und die jederzeit gewährte fachliche Unterstützung und Beratung und seine engagierte Hilfe bei der Erstellung und Korrektur dieser Arbeit und der Publikation.

Ich danke für die gute Zusammenarbeit mit dem Institut für Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie, welches an der Planung und Durchführung dieser Arbeit beteiligt war und die Beagles sowie das Labor für die Aufbereitung der Blutproben zur Verfügung stellte. Diese Arbeit entsteht nunmehr in Memoriam an Herrn Professor Dr. Fritz R. Ungemach als eines jener vielen Dinge, für die er sich trotz schwerer Krankheit uneingeschränkt einsetzte. Mit seinem Tod ist nicht nur der Veterinärmedizinischen Fakultät ein sehr guter Dozent, sondern der Veterinärmedizin ein wichtiger Wegbereiter verloren gegangen.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Dr. Getu Abraham für die Beteiligung an der Versuchsplanung und als Ansprechpartner in allen Hundeangelegenheiten.

Ebenso bedanke ich mich bei den Tierpflegerinnen Frau Hochheim und Frau Lorenz und den Laborassistentinnen des Instituts für Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie, insbesondere Frau Wieczorek, für die Unterstützung und freundliche Zusammenarbeit.

Ein großes Dankeschön geht an Herrn Professor Dr. Siegfried Wolfram, Petra Schulz und Dr. Juliane Bieger, für die freundliche Aufnahme als Gast am Institut für Tierernährung und Physiologie der Christian-Albrechts-Universität in Kiel und ihre ersten Einführungen in die Welt der HPLC, um die Grundlagen für meine Arbeit zu erlernen sowie die Rohnährstoffanalysen.

Ich danke Frau Dr. Blaschzik sowie Frau Goette und dem Labor-Team der Kleintierklinik für die Beratung zur Blutprobenentnahme und –aufarbeitung.

Ein weiterer großer Dank richtet sich an das Labor-Team des Veterinär-Physiologisch-Chemischen Institutes für die stetige Hilfsbereitschaft und das gute Arbeitsklima, insbesondere an Herrn Vallentin, der immer Ansprechpartner war, wenn ein Trouble-Shooting an der HPLC nötig war, sowie Frau Dobeleit für die Hilfsbereitschaft bei Vorversuchen am Lyophilisator.

Mein ganz besonderer Dank richtet sich an alle Mitarbeiter und Mitdoktoranden am Institut für Veterinär-Physiologie:

an Professor Dr. Jörg Aschenbach für die Beratung zur Einrichtung der HPLC-Anlage, Herrn Schillbach und Ralf Reiche für ihren Einsatz bei technischen Problemen an selbiger, an Frau Dr. Fürll, Petra Philipp, Ines Urbansky, Anke Schmidt-Mähne und Carsten Benson für die Assistenz bei den Blutprobenentnahmen und der Aufarbeitung sowie die Einweisung in die „GLP“.

Das gute Arbeitsklima, die gemeinsamen Gespräche und Feiern lassen mich diese Arbeit in besonderer Weise schätzen.

Mein größter Dank richtet sich jedoch an meine Familie die diese Arbeit mit getragen hat.